

DAIANE MARIA ROGENSKI PENTEADO

**ESTUDOS DE OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE CULTURA PARA A
MICROALGA *Phaeodactylum tricornutum* PARA PRODUÇÃO DE
LIPÍDIOS**

CURITIBA
2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE CULTURA PARA A MICROALGA
***Phaeodactylum tricornutum* PARA PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Bioquímica, no curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Departamento de Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. David Alexander Mitchell, PhD.

Co-orientadores: Miguel Daniel Nosedá e Papa Matar Ndjaye

CURITIBA
2010

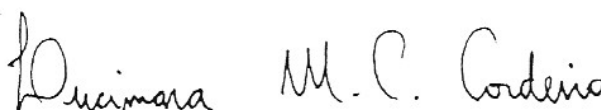
TERMO DE APROVAÇÃO**DAIANE MARIA ROGENSKI PENTEADO**

Estudos de Otimização do Meio de Cultura para a Microalga *Phaeodactylum tricornutum* para a Produção de Lipídios

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Bioquímica, no curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Departamento de Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.



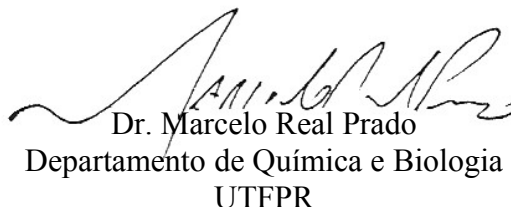
Prof. Dr. David Alexander Mitchell
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
UFPR



Prof. Dra. Lucimara Mach Cortes Cordeiro
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
UFPR



Dr. André Bellin Mariano
Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Auto-Sustentável
UFPR



Dr. Marcelo Real Prado
Departamento de Química e Biologia
UTFPR

Curitiba, 23 de fevereiro de 2010

DEDICATÓRIA

À meus pais, meu noivo,
meus irmãos e meu avô.

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Bioquímica do setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado em Bioquímica.

À CAPES, ao NPDEAS (Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento em Energia Auto-Sustentável) e a Nilko pelo apoio financeiro.

Ao Prof. PhD. David Alexander Mitchell, pela orientação e apoio.

Aos meus coorientadores Miguel Nosedá e Papa Matar Ndjaye pelas dicas indispensáveis para a realização deste trabalho.

Ao GIA, Grupo Integrado de Pesquisa em Aquicultura e Meio Ambiente, do setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, pela estrutura e apoio fundamental para a realização deste trabalho, em especial, à Alexandre Guilherme Becker.

À Prof. Dra. Lucimara M.C. Cordeiro pelas valiosas informações a respeito de microalgas e metodologias.

À Diniara Soares, em especial, pelo desenvolvimento e grande auxílio em todos os protocolos dos testes realizados.

A Doumit Camilios Netto, pela ajuda fundamental na etapa conclusiva deste trabalho, sem o qual, provavelmente grande parte dos estudos realizados não poderiam ter sido realizados.

A Wellington Balmant pelo companheirismo e inteligência na resolução dos problemas encontrados durante a realização deste trabalho. À Gracielle Viccini pelos conselhos sempre úteis.

Ao José Carlos, meu futuro marido, pelo apoio moral e financeiro e pela compreensão em todos os momentos que não pude estar presente.

Ao meu pai e minha mãe, Beto e Rosa, por não somente terem me mostrado o caminho, mas principalmente por terem me ensinado a andar com as próprias pernas. Obrigada por tudo o que vocês me proporcionaram até hoje.

Ao meu avô, por ter me acolhido por tantos anos em sua casa e sem o qual não teria cumprido boa parte de meus estudos.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Biodiesel	3
2.2 A Produção de Lipídios por Microalgas	4
2.2.1 Manipulação dos Nutrientes do Meio de Cultura	4
2.2.2 Biossíntese de Lipídios	6
2.2.2.1 Formação de acetil-CoA	6
2.2.2.2 Formação de ácidos graxos e alongação da cadeia carbônica	7
2.2.2.3 Formação de triacilgliceróis	9
2.2.3 A Influência da Concentração de Nutrientes do Meio de Cultura sobre a	9
Produção de Lipídios por Microalgas	
2.2.3.1 A influência do nitrogênio na produção de Lipídios	10
2.2.3.2 A influência do ferro na produção de	11
Lipídios	
2.2.3.3 A influência do fósforo na produção de Lipídios	11
2.2.3.4 A influência do silício na produção de Lipídios	12
2.2.3.1 A influência de uma fonte de carbono na produção de Lipídios	13
2.3 A Otimização da produção de lipídios por microalgas	14
3 OBJETIVO GERAL	17
3.1 Objetivos Específicos	17
4 METODOLOGIA	18
4.1 Cultivos	18
4.2 Experimento 1: Delineamento Plackett Burman	19
4.3 Delineamento Composto Central Rotacionado	21
4.4 Amostragem	22
4.5 Floculação	22
4.6 Biomassa Seca	22
4.7 Determinação da quantidade de Lipídios Totais	23
4.8 Determinação de Acilgliceróis	24
4.9 Análise Estatística	25
4.10 Fluxograma de Trabalho	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1 Delineamento Plackett Burmann	27
5.2 Delineamento Composto Central Rotacionado	30
5.2.1 Biomassa Seca	30
5.2.2 Lipídios	36
5.2.3 Acilgliceróis	41
6 CONCLUSÃO	48
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
ANEXO 1	53
APÊNDICE 1: Soluções estoque para preparo do meio de cultura F/2 Guillard	54
APÊNDICE 2: Preparo dos meios de cultura	57
APÊNDICE 3: Curvas de Crescimento para o planejamento DCCR	59
APÊNDICE 4: Valores encontrados nas análises para as variáveis resposta no	67
delineamento Plackett Burman e análise estatística dos dados	
APÊNDICE 4: Valores encontrados nas análises para as variáveis resposta no	69
delineamento Plackett Burman e análise estatística dos dados	

APÊNDICE 6: Análise Estatística dos Valores Obtidos para as Variáveis	72
Resposta no Delineamento Plackett Burman	
APÊNDICE 7: Análise Estatística dos Valores Obtidos para as Variáveis	92
Resposta no Delineamento Composto Central Rotacionado	

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Planejamento Plakett Burmann	20
Tabela 2 – Concentrações dos nutrientes no meio F/2 Guillard utilizadas nos expeimentos	20
Tabela 3 – Matriz de dados do DCCR	21
Tabela 4 – Concentrações dos nutrientes utilizadas nos cultivos em m/l	21
Tabela 5 – Variáveis independentes e variáveis resposta utilizadas no delineamento Plackett Burmann	27
Tabela 6 – <i>P-valores</i> das variáveis independentes que apresentaram valor menor do que 0,1 em diferentes dias de coleta de amostra	29
Tabela 7 - Variáveis independentes e variáveis resposta utilizadas no DCCR.....	30
Tabela 8 – Valores de Biomassa Seca em g/L de meio de cultura	31
Tabela 9 – Análise de variância para os resultados de biomassa seca obtidos em 8 e 15 dias de cultivo	32
Tabela 10 – Percentual de lipídios por grama de biomassa seca em 8 e 15 dias de cultivo.	36
Tabela 11 – Análise de Variância para os resultados de % de lipídios por grama de biomassa seca obtidos em 15 dias de cultivo	38
Tabela 12 – Miligramas de lipídios por litro de meio de cultura em 8 e 15 dias de cultivo.....	39
Tabela 13 – Análise da variância para os resultados de biomassa seca obtidos em 8 e 15 dias de cultivo	40
Tabela 14 – Efeito e <i>p-valor</i> das variáveis resposta em mg de acilgliceróis por litro de meio de cultura e para % de acilgliceróis pela quantidade total de lipídios extraídos para as amostras coletadas em 8 e 15 dias	44

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1 – Rotas possíveis para origem do Acetil-CoA em microalgas	7
Figura 2 – Síntese de ácidos graxos	8
Figura 3 – Síntese de triacilgliceróis a partir do ácido fosfatídico	9
Figura 4 – Representação esquemática de um DCC rotacional para k=3 fatores	16
Figura 5 – Montagem dos meios de cultura	18
Figura 6 – Fluxograma de trabalho	26
Figura 7 – Diferenças entre as técnicas gravimétrica (A) e enzimática-colorimétrica (B) .	42
Gráfico 1 – Aumento da biomassa seca (mg/L) em 8 e 15 dias	33
Gráfico 2 – Superfície de resposta para a variável dependente biomassa seca em 8 dias	34
de cultivo mostrando o efeito do nitrogênio e do glicerol	
Gráfico 3 – Superfície de resposta para a variável dependente biomassa seca em 8 dias	34
de cultivo mostrando o efeito do nitrogênio e do fosfato.....	
Gráfico 4 – Superfície de resposta para a variável dependente biomassa seca em 15 dias	35
de cultivo	
Gráfico 5 – Aumento do percentual lipídico por grama de biomassa seca em 8 e 15 dias..	37
Gráfico 6 – Aumento da quantidade de lipídios em miligramas por litro de meio de	40
cultura em 8 e 15 dias.....	
Gráfico 7 – Porcentagem de acilgliceróis obtida na quantidade de lipídios totais	43
extraídos.....	
Gráfico 8 – Miligramas de acilgliceróis por litro de meio de cultura.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

DCCR – Delineamento Composto Central Rotacionado.

NPDEAS – Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento em Energia Auto-Sustentável

GIA – Grupo Integrado de Pesquisa em Aqüicultura e Meio Ambiente

RESUMO

O biodiesel produzido a partir dos lipídios de microalgas é uma alternativa promissora aos combustíveis fósseis. Entretanto, sua produção ainda não é viável pelos altos custos. Uma forma de contornar esse problema é aumentar o rendimento em lipídios produzidos pelas microalgas. O objetivo deste trabalho foi aumentar a produção de lipídios pela microalga *Phaeodactylum tricornutum*, através da manipulação da composição do meio de cultura, por meio de um planejamento fatorial. Para isso, a microalga foi cultivada em erlenmeyers de 2 litros, utilizando-se o meio de cultura F/2 Guillard a 20°C, com luminosidade de 5500 lux, com fotoperíodo de 24 horas de luz, e com aeração constante com ar atmosférico. Foram realizados dois delineamentos fatoriais: o Plackett-Burmann para screening das variáveis independentes nitrogênio, fosfato, ferro, sílica e glicerol, e um Delineamento Composto Central Rotacionado, com as variáveis que apresentaram efeito significativo no primeiro experimento (nitrogênio, fosfato e glicerol). As variáveis resposta testadas em 8 e 15 dias de cultivo foram: biomassa seca por litro de meio, porcentagem de lipídios totais por grama de biomassa seca, miligramas de lipídios por litro de meio, porcentagem de acilgliceróis nos lipídios totais extraídos e miligramas de acilgliceróis por litro de meio. Os resultados obtidos no Delineamento Composto Central Rotacionado indicaram que no intervalo de concentrações usado, o nitrogênio e o fosfato tiveram grande influência o crescimento celular, sendo que um aumento na concentração desses nutrientes aumenta o rendimento em biomassa seca em até 228%. O glicerol mostrou-se significativo para o aumento da produção de acilgliceróis entre o 8º e o 15º dia. A quantidade total de lipídios teve um aumento de 138% entre o 8º e o 15º dia, principalmente nos tratamentos com maiores valores de biomassa seca. Observou-se que é mais vantajoso ter altas concentrações de nutrientes no meio de cultura para que se obtenha um grande número de células. Uma vez que esse grande número de células promove um esgotamento dos nutrientes do meio, como o nitrogênio e do fosfato, o crescimento pára e o metabolismo é direcionado para a formação de compostos de reserva, como os acilgliceróis. Apesar das quantidades de lipídios obtidos ainda não serem suficientes para tornar viável a produção de biodiesel a partir dessa microalga, a manipulação dos nutrientes do meio de cultura mostrou-se uma ótima ferramenta para o aumento da produção de lipídios. Estudos posteriores poderão ampliar as faixas de concentração do nitrogênio e do fosfato para obtenção melhores resultados em biomassa seca e produtividade em lipídios.

Palavras chave: microalga, lipídios, biodiesel, diferentes concentrações de nutrientes, planejamento fatorial

ABSTRACT

Biodiesel produced from oils extracted from microalgae represents a promising alternative to fossil fuels. However, currently the costs of producing microalgal oil are prohibitively high. A strategy for overcoming this problem is to increase the yield of oil within the microalgal culture. In this context, the objective of this project was to increase the production of lipids by the microalga *Phaeodactylum tricornutum*, through the manipulation of the composition of the culture medium, using factorially-designed experiments. The microalga was cultivated in 2 L Erlenmeyer flasks, using F/2 Guillard medium at 20°C, with a luminosity of 5500 lux, a photoperiod of 24 h of light and with constant aeration with atmospheric air. Two statistical designs were used: a Plackett-Burmann design for screening the effects of nitrogen, phosphate, iron, silica and glycerol and a central rotatable composite design, based on the variables that showed significant effects in the screening experiment (nitrogen, phosphate and glycerol). The response variables tested on days 8 and 15 of the cultivation were: dry biomass per liter, percent of total lipids per gram of dry biomass, mass of lipids per liter, percent of acylglycerols in the extracted lipids and mass of acylglycerols per liter. The results obtained with the rotatable central composite design indicated that, for the interval of concentrations used, nitrogen and phosphate affected growth significantly, with the dry biomass increasing with increasing concentrations of these nutrients. The concentration of glycerol had a significant effect on the increase in acylglycerol levels between days 8 and 15. The mass of lipids per liter also increased considerably between days 8 and 15, especially in the flasks that had the highest dry biomass levels. The best strategy appears to be to use high nutrient concentrations in order to obtain high biomass levels. As nitrogen or phosphate become limiting in these cultures, cell multiplication stops and the metabolism is redirected to the production of reserve compounds such as acylglycerols. Although the acylglycerol levels obtained are not yet sufficient to make the production of biodiesel from this alga viable, the use of statistically-designed experiments was a useful tool for increasing production levels. Future studies should investigate the effects of increasing nitrogen and phosphate levels to values higher than those used in the present study.

Keywords: biodiesel, microalga, nutrient concentrations, lipids, factorial design

1 INTRODUÇÃO

A preocupação em se produzir diesel a partir de fontes renováveis tem crescido devido à alta no preço do petróleo e à tendência da escassez deste produto no próximo século. O biodiesel, hoje, é produzido comercialmente a partir de plantas oleaginosas, que, apesar de ser uma fonte renovável, não é sustentável por utilizar grandes espaços para seu cultivo (MENG et al, 2008). Uma fonte alternativa de lipídeos para a produção de biodiesel é o cultivo de microalgas (PEREZ, 2007; CHISTI, 2007).

As vantagens da produção de lipídios a partir de microalgas incluem a utilização de CO₂ como fonte de carbono, a simplicidade de nutrientes necessários para seu cultivo, o fato de poderem ser cultivadas em espaços menores do que as plantas oleaginosas, em terras não aproveitáveis para agricultura e em água não utilizável para outros fins. As microalgas podem duplicar a sua biomassa em um curto período de tempo e ainda há a possibilidade de se manipular as condições de cultivo de modo a aumentar a produção de ácidos graxos (COSTA et al, 2006; HUANG et al, 2009).

Entretanto, apesar de ser promissora, a produção de lipídios de microalgas para biocombustíveis, em escala industrial, ainda tem altos custos, superando inclusive o custo de produção do biodiesel de plantas oleaginosas, o que torna essa prática ainda inviável (CHISTI, 2007). Para tornar o biodiesel de microalgas competitivo no mercado frente ao combustível de petróleo, faz-se necessário procurar estratégias para reduzir custos e aumentar a produtividade (CHISTI, 2007).

Neste contexto, o NPDEAS, Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento em Energia Auto-Sustentável da Universidade Federal do Paraná, vem trabalhando na tentativa de viabilizar a produção do biodiesel de microalgas através da construção de um fotobiorreator no qual a microalga utilizará CO₂ atmosférico e luminosidade ambiente para produzir lipídios. Este projeto engloba diferentes áreas do conhecimento e tem entre seus participantes, alunos das áreas de Engenharia Mecânica, Biotecnologia, Química e Bioquímica.

Este trabalho está inserido dentro desse projeto e teve por objetivo aumentar a produtividade de lipídios, já que este é um ponto que contribuiria para a diminuição dos custos de produção e para tornar o biodiesel viável economicamente. Para isso, foi realizada a manipulação dos nutrientes no meio de cultivo da microalga gerando uma situação de estresse fisiológico ao qual a microalga responde preparando a célula para um período de privação direcionando seu metabolismo para a produção de componentes de reserva, como os lipídios,

tendo maior interesse neste caso, os acilgliceróis (GREENE; GEIDER; FALKOWSKI, 1991; LOURENÇO, 2006).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biodiesel

O aumento do preço do petróleo e a sua potencial escassez, aliada às já conhecidas consequências ambientais que seus derivados trazem, como a emissão de altos níveis de CO₂ e compostos sulfurados para a atmosfera, dois dos principais gases responsáveis pelo efeito estufa, levam muitos pesquisadores à busca por fontes renováveis e sustentáveis de energia. O biodiesel tem tido especial atenção frente às fontes alternativas de combustíveis (MENG et al, 2008).

O biodiesel pode ser produzido a partir da transesterificação ou alcoólise dos triacilgliceróis, reação na qual esses compostos reagem com metanol ou etanol, resultando em ésteres de cadeia longa e uma molécula de glicerol (SONG; FU; SHI, 2008; CHISTI, 2007). Possui algumas vantagens sobre o diesel de petróleo: além de ser renovável, o biodiesel emite menos dióxido de carbono e compostos sulfurados para a atmosfera após sua queima, além de não emitir compostos aromáticos, reduzindo seu impacto ambiental (MENG et al, 2008; HUANG et al, 2009). Pode ainda ser adicionado ao diesel de petróleo, sem a necessidade de modificar a engenharia do equipamento onde este combustível está sendo utilizado (SONG; FU; SHI, 2008).

Em todo o mundo, vários tipos de lipídios têm sido escolhidos para o processamento em biodiesel, como os óleos vegetais, gorduras animais (MENG et al, 2008) e óleo de fritura (CHISTI, 2007). Entre as plantas oleaginosas mais utilizadas na produção de lipídios para produção de biodiesel, encontram-se a soja, o algodão, a palma, e a canola (SONG; FU; SHI, 2008; CHISTI, 2007; O BIODIESEL, 2009). Mas, além dos altos custos de produção, para que a produtividade em óleo das plantas oleaginosas supra a demanda por combustíveis, estas deveriam ser cultivadas num território muito extenso, o que se torna impraticável já que poderia causar uma crise na produção de alimentos em todo o mundo (CHISTI, 2007).

Diante deste problema, os microrganismos oleaginosos são considerados uma boa alternativa para a produção de lipídios para conversão em biodiesel. Há uma diversidade enorme de microrganismos que armazenam lipídios, como microalgas, fungos, leveduras e bactérias. As microalgas sobressaem-se pela sua capacidade de produção de lipídios semelhante à das plantas oleaginosas, por utilizarem como fonte de carbono o CO₂ (MENG et al 2008; TAKAGI; YOSHIDA, 2005).

As microalgas são microrganismos fotossintetizantes que variam de uni a pluricelulares, com estrutura procariótica ou eucariótica, e podem ser encontradas em diferentes ambientes como água salgada, água doce e mesmo no solo. A maioria das espécies apresenta crescimento mais rápido que as plantas terrestres, além de poderem ser cultivadas em uma área pequena comparada às plantas oleaginosas, com rendimento em lipídios igual ou superior (HUANG et al, 2009; TEIXEIRA, 2008; PEREZ, 2007; DERNER, 2006). Para a produção de biodiesel é necessário que a matéria prima utilizada seja rica em triglicerídeos com cadeia carbônica longa, de 14 a 18 carbonos, que são facilmente transesterificáveis (HUANG et al, 2009). As microalgas atendem a esse requisito, pois sua composição lipídica compreende até 80% de triglicerídeos dos lipídios totais extraídos, conforme a idade do cultivo, sendo estes triglicerídeos formados por ácidos graxos de cadeia longa, em torno de 16 a 18 carbonos (MENG et al, 2008). Desses ácidos graxos, a maioria é polinsaturada (HARWOOD; GUSCHINA, 2009). Para produção de biodiesel, esse grande número de insaturações no óleo de microalga diminui sua aceitação, devido à facilidade desse óleo em sofrer oxidação durante a estocagem, mas este problema pode ser facilmente minimizado através de uma reação de hidrogenação catalítica (MENG et al, 2008).

O óleo de microalga possui características semelhantes às dos óleos de plantas oleaginosas e se enquadra dentro das principais características exigidas pela ANP (Agência Nacional de Petróleo) para qualidade do biodiesel, como o ponto de fulgor mínimo de 115°C e baixo índice de acidez (menor que 0,8 mg KOH/g) (TEIXEIRA, 2008).

Atualmente, várias algas têm sido estudadas para produção de lipídios. Entre elas estão a *Chlorella vulgaris* (LIU, WANG, ZOU, 2008); *Dunalliella salina* (TAKAGI; YOSHIDA, 2005), *Spirulina platensis* (SANTOS; MACEDO; ALEGRE, 2003), *Phaeodactylum tricornutum* (SIRÓN; GIUSTI; BERLAND, 1989; KAIXIAN; BOROWITZKA, 1993), e *Monodus subterraneus* (KHOZIN-GOLDBERG; COHEN, 2006).

2.2 A Produção de Lipídios por Microalgas

2.2.1 Manipulação dos Nutrientes do Meio de Cultura

A quantidade de lipídios de uma célula microalgal varia de 1 a 70% da biomassa seca, mas pode alcançar até 90% sob determinadas condições para algumas espécies (MENG et al, 2008). Essa quantidade lipídica é afetada por fatores ambientais ou nutricionais sendo que o

controle desses fatores pode ser utilizado para aumentar a quantidade de lipídios (COURCHESNE et al, 2009).

Os fatores ambientais incluem o cultivo controlado em fotobiorreatores ou em tanque aberto (ALONSO et al, 2000) além de pH, aeração, fotoperíodo (COURCHESNE et al, 2009). O cultivo em tanque aberto é comum para produção de biomassa de *Spirulina* e *Chlorella*, microalgas de alto valor nutritivo, já intensivamente comercializadas. Os tanques são baratos e de fácil operação, mas apresentam a desvantagem da fácil contaminação, além da baixa qualidade do produto final. Já os fotobiorreatores são mais complicados para operar, mas permitem condições controladas do cultivo e alta qualidade dos produtos finais, bem como uma densidade celular maior que nos tanques abertos (SONG; FU; SHI, 2008).

Como fatores nutricionais que podem aumentar a quantidade de lipídios totais, pode-se citar a privação de nitrogênio, (SPOLAORE, 2006; MENG et al, 2008), o aumento da concentração do ferro (LIU; WANG; ZHOU, 2008; KUDO et al, 2001), a privação de silício em algas que possuem revestimento externo desse mineral (SIRÓN; GIUSTI; BERLAND, 1989), a deficiência de fósforo (LOMBARDI; WANGERSKI, 1991), e a presença de uma fonte de carbono para microalgas que tenham capacidade heterotrófica (CERÓN GARCÍA, et al, 2000).

A composição da alga está relacionada à integração de vários processos envolvidos na captação e assimilação desses nutrientes. É bem relatado que a deficiência de um nutriente leva o microrganismo a aumentar a captação daquele nutriente bem como a eficiência metabólica dos processos em que este nutriente está envolvido. Na maioria desses casos, a maior captação do nutriente está relacionada ao aumento dos sítios de captação no plasmalema e a indução de isozimas com diferentes propriedades cinéticas que aumentam a afinidade por este nutriente (BEARDALL; YOUNG; ROBERTS, 2001).

Quando o meio é deficiente em nitrogênio ou fósforo, o que pode ocorrer na fase estacionária do cultivo ou quando o meio de cultura adicionado é pobre nessas substâncias, as células exibem um aumento da velocidade de captação do nutriente limitante. À medida que o nutriente vai se esgotando no meio, fica mais difícil para a célula encontrar esse nutriente. O fato de a célula ter aprimorado seus sistemas de captação para manter sua velocidade de crescimento, e não haver disponibilidade do nutriente para isso ocorrer, gera um estresse fisiológico que aumenta à medida que a concentração dos nutrientes diminui. Esse estresse altera o metabolismo microalgal, direcionando os processos metabólicos para a produção de lipídios de reserva para preparar a célula para o período de privação (MENG, 2008;

LOURENÇO, 2006; SANTOS; MACEDO; ALEGRE, 2003; BEARDALL; YOUNG; ROBERTS, 2001; ALONSO et al, 2000; GREENE; GEIDER; FALKOWSKI, 1991).

As microalgas sintetizam duas classes principais de lipídios: (a) lipídios neutros, que compreendem os mono, di e triacilgliceróis; e (b) lipídios polares que incluem os fosfolipídios e galactolipídios. Esses lipídios são produzidos a partir das fontes de carbono fornecidas à microalga, seja elas orgânicas, como a glicose, acetato ou glicerol, ou inorgânicas como o dióxido de carbono (CO₂) (HUANG et al, 2009). O perfil lipídico, ou seja, as proporções relativas de lipídeos neutros e polares, altera-se com a fase do ciclo de crescimento em que o cultivo se encontra: exponencial ou estacionária. Lipídios neutros são mais abundantes em células na fase estacionária. Lipídios polares e os lipídios polinsaturados são mais abundantes na fase exponencial do cultivo (ALONSO et al, 2000).

Essa mudança do perfil lipídico com a idade é explicada por Grima et al (1994) pela quantidade de nutrientes e luminosidade. Se há disponibilidade de nutrientes, a tendência do cultivo é possuir um maior número de células gerando uma maior competição nutricional e menor disponibilidade de luz. Nessa condição, a alga é obrigada a ativar um aparato fotossintético mais complexo e passa a sintetizar mais lipídios polares para fazer parte das membranas dos cloroplastos. Isso quer dizer que células jovens, na fase exponencial do cultivo, tendem a captar mais nitrogênio pela alta disponibilidade deste nutriente no meio, produzindo, assim, mais lipídios polares. Quando há depleção de nutrientes e uma alta concentração de células, a captação de N e P diminui, as células param de se multiplicar e o cultivo entra na fase estacionária. A célula então passa a utilizar fontes de carbono, orgânico ou inorgânico desde que disponíveis, para manutenção do seu metabolismo e para produção de lipídios de reserva.

2.2.2 Biossíntese de Lipídios:

A biossíntese de triglicerídeos nas microalgas compreende três etapas principais: a formação de acetil coenzima A (acetil-CoA) no citoplasma, a elongação e dessaturação das cadeias carbônicas dos ácidos graxos e a formação dos triacilgliceróis (HUANG et al, 2009).

2.2.2.1 Formação de acetil-CoA

As rotas de utilização de fontes de carbono, como o dióxido de carbono, levam à formação de acetil-CoA nos cloroplastos durante as reações fotossintéticas e ciclo de Calvin.

O piruvato originado na via glicolítica é convertido pelo complexo piruvato desidrogenase em acetil-CoA (LEHNINGER, 2004; YANG; HUA; SHIMIZU, 2000).

O gliceraldeído-fósforo (GAP), precursor do piruvato, é o ponto chave das duas vias. O GAP é formado no ciclo de Calvin (figura 2) em reações de fixação de CO₂ e durante a via glicolítica. Pode também ser formando a partir de outras fontes orgânicas de carbono. O GAP é exportado do cloroplasto ao citoplasma onde é utilizado na síntese de lipídios para a formação de ácidos graxos, na síntese de açúcares ou na oxidação a piruvato pela via glicolítica (Figura 1) (HUANG et al, 2009).

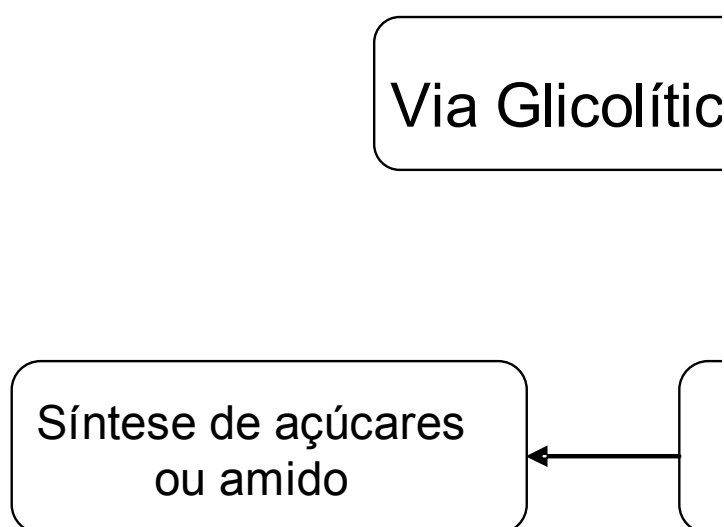


Figura 1 - Rotas possíveis para origem do Acetil-CoA em microalgas.

2.2.2.2 Formação de ácidos graxos e alongação da cadeia carbônica

A síntese da cadeia carbônica dos ácidos graxos depende principalmente da reação de dois sistemas enzimáticos: a ACCE (acetil-CoA carboxilase), responsável pela conversão do acetil-CoA em malonil-CoA, e a FAS (ácido graxo sintase), responsável por ativar os grupos acetil e malonil para iniciar o processo de alongação. Estas etapas estão simplificadas na figura 2. Em cada passagem por este ciclo, a cadeia carbônica é estendida em 2 carbonos. (LEHNINGER, 2004).

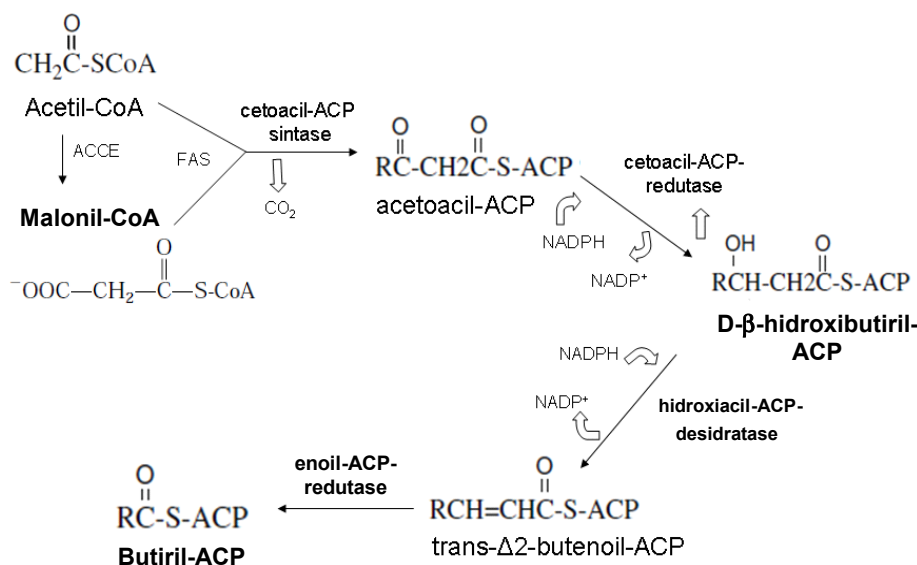


Figura 2 - Síntese de ácidos graxos. Após a ativação pela FAS, a primeira reação de formação da cadeia de ácido graxo é a condensação dos grupos malonil e acetil para formar acetoacil-ACP. Simultaneamente, uma molécula de CO_2 é produzida. Nesta reação, catalisada pela cetooacil-ACP sintase, o grupo acetil é transferido do grupo Cys-O-SH da enzima ao grupo malonil-CoA no O-SH da ACP, iniciando a unidade metil-terminal de dois carbonos do novo grupo aceto-acil. O grupo acetoacil-ACP formado na etapa da condensação sofre redução do grupo carbonil no C-3 para formar D-β-hidroxiacil-ACP. Esta reação é catalisada pelo cetooacil-ACP-redutase e o doador de elétrons é o NADPH. Os elementos de água são então removidos do carbono 2 e 3 do D-β-hidroxiacil-ACP para produzir uma dupla ligação no produto, trans-Δ2-butenoil-ACP. A enzima que catalisa esta desidratação é a hidroxiacil-ACP-desidratase. Finalmente, a dupla ligação do trans-Δ2-butenoil-ACP é reduzida (saturada) para formar butiril-ACP pela ação da enoil-ACP-redutase. Novamente o NADPH é o doador de elétrons (LEHNINGER, 2004).

A formação de ácidos graxos de cadeia curta ($\text{C}_{14} - \text{C}_{18}$) é similar em células de plantas superiores, animais, fungos, bactérias e algas. Em microalgas, a dessaturação da cadeia carbônica do ácido graxo ocorre no carbono 18 e facilita a elongação da cadeia carbônica para produzir ácidos graxos de cadeia longa, o que é incomum em plantas. Ácidos graxos de cadeia longa ($\text{C}_{20} - \text{C}_{22}$) são produzidos com frequência pelas microalgas, mas a quantidade varia de espécie para espécie. Entretanto, um alto conteúdo de ácidos graxos de cadeia longa não é desejável para o biodiesel, e, portanto, algas ricas em ácidos graxos de cadeia longa (maiores que 18 carbonos) não devem ser selecionadas para produção de biodiesel (HUANG et al, 2009).

2.2.2.3 Formação de Triacilgliceróis:

Os precursores da formação de triacilgliceróis são os compostos acil-CoA graxo, formado a partir de ácidos graxos sob ação da acil-CoA sintetase, e L-glicerol-3-fósforo, formado através da ação da glicerol-3-fósforo-desidrogenase. A condensação destes precursores é apresentada na figura 3 (LEHNINGER, 2004).



Figura 3 - Síntese de triacilgliceróis a partir do ácido fosfatídico. A primeira etapa da biossíntese de triacilgliceróis é a acilação de 2 grupos hidroxila livres do L-glicerol-3-fósforo por duas moléculas de acil-CoA graxo, denominado ácido fosfatídico ou fosfatidato. Este ácido fosfatídico pode ser convertido em triacilglicerol. Na formação de triacilglicerol, o ácido fosfatídico é hidrolisado pela ácido-fosfatídico fosfatase para formar 1,2-diacilglicerol. Os diacilgliceróis são convertidos em triacilgliceróis pela transesterificação com uma terceira molécula de acil-CoA graxo (LEHNINGER, 2004).

2.2.3 A Influência da Concentração de Nutrientes do Meio de Cultura sobre a Produção de Lipídios por Microalgas

A literatura que envolve o estudo de microalgas submetidas a diferentes condições de crescimento é vasta, principalmente sobre a relação da privação de nutrientes e seus efeitos no aparato fotossintético. Por outro lado, a informação sobre a relação entre a privação de nutrientes e a produção de lipídios ainda é bastante limitada, bem como estudos com a

microalga *Phaeodactylum tricornutum*. Por essa razão as informações a seguir são generalizadas para todas as microalgas.

2.2.3.1 A influência do nitrogênio na produção de lipídios

O nitrogênio é um dos principais elementos para o desenvolvimento microalgal, podendo ser assimilado através de várias fontes, como N_2 , NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^- , uréia, aminoácidos, purinas e pirimidinas (LOURENÇO, 2006).

Os sais de nitrato, sais de amônio e de uréia são as fontes mais empregadas em cultivos artificiais. Se o suprimento de nitrogênio é abundante em cultivos, verifica-se tendência do aumento nas concentrações de proteínas e clorofila nas células. Contrariamente, quando as concentrações de nitrogênio são baixas, verifica-se uma diminuição marcante da taxa de divisão celular, além da redução das concentrações de proteínas e clorofila (LOURENÇO, 2006).

Como já visto anteriormente, a depleção de nitrogênio pode aumentar o conteúdo lipídico de uma microalga (SANTOS; MACEDO; ALEGRE, 2003; GRANT, 2001; ALONSO et al, 2000). Isso é explicado pelo fato de que a falta de nitrogênio direciona o metabolismo microalgal, antes voltado à multiplicação celular, para a produção de componentes de reserva, como os ácidos graxos saturados, para preparar a célula para um período de privação (ALONSO et al, 2000).

Youngmanitchai e Ward (1991) relataram que a concentração de nitrogênio no meio interfere na grau de insaturação dos lipídios produzidos. Para algumas microalgas, como a *Dunaliella salina* e *Botryococcus braunii*, a depleção de nitrogênio aumenta a produção de ácidos graxos polinsaturados. Já para a *Phaeodactylum tricornutum*, a produção desses ácidos graxos diminui sob privação e aumenta em um meio rico em nitrogênio.

Santos, Macedo e Alegre (2003) privaram a alga *Spirulina maxima* de nitrogênio, e obtiveram um aumento de até 207% de lipídios totais por grama de biomassa seca. Kaixian e Borowitzka (1992) submeteram a microalga *Phaeodactylum tricornutum* à privação de nitrogênio e obtiveram um aumento de aproximadamente 20% na produção de lipídios por grama de biomassa seca em meio F/2 Guillard.

2.2.3.2 A influência do ferro na produção de lipídios

No ambiente natural, muitas vezes a baixa biodisponibilidade de ferro limita o crescimento microalgal, já que o ferro é um importante cofator em vários processos bioquímicos, como, por exemplo, na redução de nitrato, nitrito e sulfato, na via biossintética da clorofila e dos citocromos, na fotossíntese e na cadeia de transporte de elétrons, na fixação de nitrogênio molecular e na detoxificação de espécies reativas de oxigênio (LOURENÇO, 2006; KUDO et al, 2001; GREENE; GEIDER; FALKOWSKI, 1991).

O ferro ocorre em várias formas químicas, sendo que o Fe^{2+} é mais solúvel que o Fe^{3+} em meio aeróbico e pH neutro a alcalino. Os microrganismos não têm capacidade de assimilar o ferro na sua forma iônica, mas sim na forma ligada a agentes quelantes, como o EDTA ou substâncias húmicas, que tornam o ferro biodisponível (LOURENÇO, 2006).

O único trabalho encontrado na literatura relacionando o conteúdo lipídico microalgal com a concentração de ferro foi o de Liu, Wang e Zhou (2008). Esses pesquisadores demonstraram que a adição de ferro prolongou a fase exponencial de *Chorella vulgaris* quando adicionado quando a alga havia quase chegado à fase estacionária. Mostraram ainda que a suplementação de ferro no início do cultivo causa uma diminuição do crescimento celular, mas estimula a produção de lipídios neutros em 56,6% quando comparada a produção com um padrão, sem suplementação de ferro.

2.2.3.3 A influência do fósforo da produção de lipídios:

O fósforo tem importantes funções na célula, estando envolvido em transferência de energia e constituição de moléculas como o ATP, açúcares fosfatados, ácidos nucleicos e fosfoenzimas (LOURENÇO, 2006).

No meio de cultivo, o fósforo pode ser adicionado na forma de fósforos e polifósforos, como fósforo de sódio e potássio. Fósforo de cálcio e de ferro se formam no meio, mas são indisponíveis para as algas por formarem complexos insolúveis. Por esse motivo, há necessidade de se colocar um excesso de fósforo no meio. Nesta condição, as microalgas absorvem até 16 vezes mais do que sua necessidade mínima, o que garante o crescimento da célula por um período quando houver privação desse nutriente (CHISTI, 2007; LOURENÇO, 2006).

A deficiência de fósforo no meio afeta o perfil lipídico da célula com mais intensidade do que afeta a quantidade de lipídios produzidos por biomassa seca. Já que o fósforo faz parte dos fosfolipídios, uma limitação deste nutriente direciona o metabolismo da microalga para a produção de triglicerídeos saturados e lipídeos neutros, e ainda causa uma diminuição de ácidos graxos polinsaturados (SIRÓN; GIUSTI; BERLAND, 1989).

Alguns trabalhos relatam um aumento na quantidade de lipídios totais intracelulares, aliada à diminuição do crescimento celular e mudanças no perfil lipídico da célula com a privação de fósforo no meio. Khozin-Goldberg e Cohen obtiveram um aumento em 15,5% em ácidos graxos polinsaturados e 39% de triacilgliceróis cultivando a *Monodus subterraneus* em meio de cultura deficiente em fósforo (KHOZIN-GOLDBERG; COHEN, 2006). Lombardi & Wangerski (1991), submeteram a microalga *Chaetoceros gracilis* a um meio deficiente em fósforo e obtiveram um aumento da quantidade de lipídios totais intracelulares atribuída a uma maior produção de triglicerídeos. Obtiveram ainda uma diminuição da produção de fosfolipídios e também um baixo crescimento celular. Esses resultados são consequência da redução da divisão celular e da síntese de clorofila causada pela limitação de fósforo. A baixa captação desse nutriente alterou a velocidade de crescimento da microalga, gerando uma situação de estresse fisiológico, que direcionou o metabolismo da célula principalmente para produção de triacilgliceróis (LOMBARDI ; WANGERSKI, 1991).

2.2.3.4 A influência do silício na produção de lipídios

Geralmente o silício é adicionado em meios de cultura na forma de sais de silicato de sódio hidratado. Apenas as microalgas pertencentes à classe das diatomáceas e silicoflagelados necessitam de silício em altas concentrações, pois somente estas microalgas têm o silício como um componente de suas estruturas de revestimento externa. As diatomáceas têm uma demanda tão alta por silício quanto de nitrogênio, recomendando-se uma proporção igual desses dois elementos. Em situações de limitação por silício, verifica-se uma diminuição da espessura da parede celular dessas algas (LOURENÇO, 2006).

Uma baixa disponibilidade de silício induz nas diatomáceas um aumento na produção de lipídios (KYLE et al, 1986). Alguns pesquisadores conseguiram aumentar o percentual de lipídios por biomassa seca produzidos por diatomáceas como a *Chaetoceros gracilis*, *Hantzschia* DI-60 e a *Cyclotella cryptica*, embora tenha sido relatado uma diminuição

considerável do crescimento celular (ROESLLER, 2008; LOMBARDI; WANGERSKI; 1991; SRIHARAN et al, 1990).

Não foi encontrado na literatura um mecanismo bioquímico pelo qual a privação de silício leve a microalga a aumentar sua produção de lipídios. Neste trabalho, sugere-se que a deficiência desse mineral não permita que a microalga produza corretamente sua estrutura de revestimento, e isso poderia induzir uma situação de estresse fisiológico, direcionando o metabolismo microalgal a produzir substâncias que permitiriam a sobrevivência do microrganismo, como os lipídios de reserva.

2.2.3.5 A influência de uma fonte de carbono na produção de lipídios

O carbono é o elemento necessário em maiores quantidades para algas, pois constitui em torno de 50% da biomassa seca (DERNER, 2006). Pode estar na forma inorgânica, como o CO_2 e compostos derivados (H_2CO_3 , HCO_3^- , ou CO_3^{2-}), sendo proveniente do ar atmosférico ou de ar injetado na cultura, ou na forma orgânica, como a glicose, acetato, lactato e aminoácidos. Algumas microalgas autotróficas só assimilam o carbono inorgânico, que se difunde da água para o interior das células e é usado em vários processos metabólicos, como a fixação do próprio carbono. Algumas microalgas também podem assimilar outras fontes de carbono e, quando a microalga consegue assimilar o CO_2 e carbono orgânico simultaneamente, pode-se chamar esse cultivo de mixotrófico (DERNER, 2006). O glicerol tem especial interesse como fonte de carbono, por ser um resíduo da reação de transesterificação durante a produção de biodiesel (CERÓN GARCIA et al, 2000).

Sob condições mixotróficas, algumas microalgas aumentam sua taxa de crescimento e sua biomassa, além de produzirem uma maior concentração de ácidos graxos (CERÓN GARCÍA, 2000). Isso pode ser explicado pelo fato de que o uso de fontes suplementares de carbono minimiza as consequências do autossombreamento causado pela elevada densidade celular. Com a baixa disponibilidade de luz em cultivos densos, a assimilação do carbono inorgânico pelas microalgas fica prejudicada. Se a alga consegue assimilar mais carbono, aumenta sua produção de carboidratos, proteínas e lipídios (DERNER, 2006).

Alguns autores reportam um aumento da biomassa seca e aumento da produção de lipídios pela microalga *Phaeodactylum tricornutum* utilizando fontes de carbono como extrato de centeio, trigo ou batata (FÁBREGAS et al, 1996), glicose e glicerol (CERÓN GARCIA et al, 2000). Por exemplo, Cerón García e colaboradores (2000) adicionaram glicerol ao meio durante o cultivo dessa microalga e obtiveram uma produção de biomassa seca 74% maior do

que um controle sem esse composto e ainda um percentual de lipídios por biomassa seca 3 vezes maior do que o controle sem glicerol.

2.3 A Otimização da produção de lipídios por microalgas

A produção em larga escala de biomassa de microalgas é um processo complexo envolvendo um grande número de variáveis e, para que seja alcançado um crescimento satisfatório, as condições ambientais devem ser condicionadas de acordo com as necessidades do microrganismo (RAOOF; KAUSHIK; PRASANNA, 2006). Tais condições afetam diretamente a densidade e a composição bioquímica das algas. Esses fatores ainda podem variar em função da velocidade de crescimento e das diferentes fases do ciclo de vida microalgal (COSTA et al 2006).

Para se estudar a melhor condição de crescimento e as necessidades nutricionais de um microrganismo, sua taxa de crescimento é medida na presença de um nutriente específico. Se a falta desse nutriente diminui a velocidade de crescimento, deduz-se que esse nutriente é um fator limitante. Uma vez que os fatores limitantes são estabelecidos, estuda-se sua influência sobre a produção de um determinado componente metabólico, como pigmentos, proteínas e lipídios (BEARDALL; YOUNG; ROBERTS, 2001).

A maioria desses estudos é realizada mantendo-se todas as condições de crescimento do meio e variando-se apenas um componente. Na literatura, vários trabalhos usam essa metodologia para estudar a influência de um nutriente sobre a composição de uma microalga. Entretanto, para estudos de otimização, nos quais precisa-se saber qual a melhor concentração de vários nutrientes para a produção de um componente específico, essa metodologia torna o processo demorado e caro (MONTGOMERY, 2001).

Como uma estratégia de otimização alternativa utiliza-se o planejamento fatorial, que é mais eficiente quando se trata de otimizações envolvendo diferentes variáveis e suas interações. Essa estratégia permite que várias variáveis ou fatores em diferentes níveis sejam analisados simultaneamente, minimizando o número de tratamentos a serem realizados simultaneamente num experimento. Além de permitir a visualização do efeito de cada fator sobre uma variável resposta (ou variável dependente), possibilita visualizar o efeito da interação desses fatores sobre a variável resposta (BRITO et al, 2002; KAPS; LAMBERSON, 2004; TOLEDO, 2009).

O primeiro passo para a otimização utilizando planejamento fatorial consiste na identificação dos fatores, ou variáveis independentes, que interferem num processo, ou seja, os fatores responsáveis pela maior variação das variáveis de resposta em estudo. Em seguida, determina-se os níveis dos tratamentos que serão realizados (RODRIGUES; IEMA, 2005). Os fatores indicados pela literatura que mais interferem na produção de lipídios pelas microalgas são a concentração de nitrogênio, de fósforo, de ferro, de silício, no caso de algas que possuam revestimento desse mineral, e da fonte de carbono, no caso de algas heterotróficas (LIU; WANG; ZHOU, 2008; MENG et al, 2008; ROESSLER, 2008; COSTA, 2006; DERNER, 2006; KHOZIN-GOLDBERG; COHEN, 2006; SANTOS; MACEDO; ALEGRE, 2003; ALONSO et al, 2000; CERÓN GARCIA, 2000; KUDO et al, 2000; KAIXIAN; BOROWITZKA, 1993; YONGMANITCHAI; WARD, 1991; SRIHARAN; BAGGA; SRIHARAN, 1990; SIRÓN; GIUSTI; BERLAND, 1989).

O próximo passo é definir um melhor modelo experimental que defina como esses experimentos devem ser realizados, ou seja, de que forma os fatores serão associados. Existem vários tipos de modelos experimentais como os fatoriais completos, fatoriais fracionados e os delineamentos de *screening* (BRITO et al, 2002).

Quando precisa-se testar um grande número de fatores para identificar quais deles são importantes, ou seja, quais tem mais influência sobre as variáveis dependentes de interesse, pode-se empregar um delineamento que permite testar o maior número de efeitos desses fatores com o menor número possível de experimentos, como o Plackett-Burman. Este tipo de experimento é chamado de “experimento de filtragem” ou “screening experiment” e permite a escolha das variáveis que são importantes na análise e descartar as que não têm influência na resposta que se pretende estudar. Além disso, ajuda a definir a região que contém o ótimo (MATEUS; BARBIN; CONAGIN, 2000).

Após seleção das variáveis que tenham influência nas respostas, passa-se aos delineamentos mais detalhados que permitirão a otimização, como os delineamentos compostos centrais (DCC). Os DCC's são delineamentos fatoriais simétricos (todos os pontos equidistantes do ponto central) e de segunda ordem, que possuem características interessantes para a busca de um ponto que dê a resposta ótima: um número menor de tratamentos em relação aos fatoriais completos e o fato de poderem ser realizados sequencialmente, de forma a caminhar no sentido da otimização do sistema. Podem ser do tipo ortogonal ou rotacional (MATEUS; BARBIN; CONAGIN, 2000).

O delineamento composto central rotacional (DCCR) é constituído de uma parte fatorial 2^k , uma parte axial e pontos centrais. No caso de três fatores, por exemplo, o composto central completo com o menor número possível de pontos, há uma parte fatorial ($2^3 = 8$ tratamentos nos níveis -1 e +1, para cada fator), que permite estimar todos os efeitos de primeiro grau e o efeito das interações, seis pontos na parte axial (nos níveis $-\alpha$ e $+\alpha$ para um dos eixos e no nível zero para os outros dois fatores) e, ainda, um ponto na parte central do delineamento, abrangendo $2^3 + 2.(3) + 1 = 15$ pontos. O valor de α define se o delineamento será do tipo ortogonal ou rotacional, por exemplo, α igual a 1,21 é um DCC ortogonal e um α de 1,68 é um DCC rotacional (MATEUS; BARBIN; CONAGIN, 2000).

Os pontos centrais melhoram as estimativas dos efeitos quadráticos e possibilitam graus de liberdade adicionais para o erro. Além disso, os pontos centrais permitem informação extra quanto ao centro da região experimental, onde os melhores valores resposta estão frequentemente localizados (MATEUS; BARBIN; CONAGIN, 2000). A figura 4 é uma representação esquemática de um DCCR com 3 fatores.

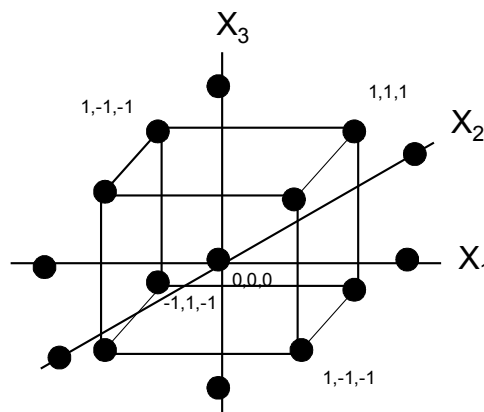


Figura 4 - Representação esquemática de um DCC rotacional para $k=3$ fatores. Fonte: MATEUS, BARBIN, CONAGIN, 2000.

Analisa-se então os resultados, plotando-se em gráficos de superfície de resposta ou contorno, que permitem a visualização do ponto em que a combinação das variáveis dá a melhor resposta (RODRIGUES, IEMMA, 2005; GONG; CHEN, 1997).

A superfície de resposta pode ser descrita pela equação:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \varepsilon$$

onde:

- X_1 , X_2 e X_3 são as variáveis referentes aos fatores;
- β_0 é o ponto de interseção;
- β_1 , β_2 , β_3 são referentes aos efeitos lineares;
- β_{11} , β_{22} , β_{33} são referentes aos efeitos quadráticos;

- β_{12} , β_{13} , β_{23} são referentes aos efeitos de interação dupla
- ε – é o erro experimental (MATEUS; BARBIN; CONAGIN, 2000).

Neste trabalho, estes métodos de planejamento estatístico serão usados para avaliar a influência e otimizar as concentrações nutrientes citados (nitrogênio, fósforo, ferro, silício e glicerol) com o objetivo de obter um aumento do rendimento da produção de lipídios pela microalga *Phaeodactylum tricornutum*.

3 OBJETIVO GERAL

- Otimizar o meio de cultura para a microalga *Phaeodactylum tricornutum* para maximizar a produção de lipídios.

3.1 Objetivos específicos

- Preparar meios de cultivos com diferentes concentrações de nutrientes de acordo com as matrizes estatísticas dadas pelos planejamentos fatoriais;
- Separar e quantificar a biomassa da microalga bem como analisar a quantidade de lipídios e acilgliceróis produzidos;
- Selecionar entre as variáveis independentes nitrogênio, fósforo, ferro, silício e glicerol, quais tem maior efeito nas variáveis-resposta: biomassa seca, percentual de lipídios por grama de biomassa seca, miligramas de lipídios por litro de meio de cultura, percentual de acilgliceróis por lipídios totais extraídos e miligramas de acilgliceróis por litro de meio de cultura para a microalga *Phaeodactylum tricornutum*, através do delineamento fatorial Plackett Burmann;
- Realizar um Delineamento Composto Central Rotacionado com as variáveis selecionadas no primeiro delineamento para verificar as melhores concentrações dos nutrientes a serem utilizadas no meio de cultura;
- Realizar uma análise estatística detalhada dos dados obtidos para verificar a significância estatística dos efeitos das variáveis independentes nas variáveis resposta;
- Gerar gráficos de superfície para avaliar os resultados obtidos.

4 METODOLOGIA

4.1 Cultivos:

A microalga *Phaeodactylum tricornutum* foi obtida pelo NPDEAS e foi cedida pela Universidade Federal de Santa Catarina. Essa microalga foi selecionada pelo NPDEAS por apresentar uma produtividade em lipídios entre 20 a 30% (CHISTI, 2007) e por este trabalho estar inserido nesse grupo, determinou-se que esta seria a microalga a ser pesquisada. Os cultivos foram realizados no GIA (Grupo Integrado de Pesquisa em Aquicultura e Meio Ambiente) da Universidade Federal do Paraná. Essa microalga foi cultivada em erlenmeyers com capacidade para 2 litros, mantidos em ambiente de temperatura controlada de 18° a 20°C. A intensidade luminosa simulava a luz do dia e era de 5500 lux (medida com luxímetro Minipa MLM-1010) mantida por lâmpadas fluorescentes de 40 W e procurou-se manter os frascos sempre à mesma distância das lâmpadas.

A aeração com ar atmosférico era constante e realizada por uma bomba compressora, da marca IBRAN, com 5,533 cv, a qual foram acoplados tubos de PVC de 5 mm de diâmetro e regulada uma vazão aproximada de 2,75 litros de ar por minuto. Para a distribuição do ar em cada erlenmeyer, foram conectadas a estes tubos pipetas Westergreen, previamente autoclavadas, de 2 mL, que chegavam até o fundo do erlenmeyer. Antes de chegar aos meios, o ar era filtrado com cartuchos de celulose. Os erlenmeyers foram selados com papel alumínio e filme de PVC para evitar contaminação e manter os tubos e a pipeta dentro do recipiente. A montagem desse experimento se encontra na figura 5.



Figura 5 - Montagem dos meios de cultura

O meio de cultura utilizado foi o meio F/2 Guillard, cuja composição tradicional e preparo segue no apêndice 1. As concentrações dos nutrientes nitrogênio (NaNO_3), fósforo (NaHPO_4), ferro (FeCl_3) e silício ($\text{NaSiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) foram modificadas durante cada

experimento, conforme planejamento experimental. Adicionou-se ainda diferentes concentrações de glicerol (Synth) como fonte de carbono.

A água do mar utilizada na composição desse meio de cultura foi procedente da Baía de Guaratuba - PR, coletada sempre nos dias de maré forte (lua cheia ou lua nova) e no horário de da maré alta, para garantir o mínimo de diluição pela água doce dos rios locais. Chegando ao local de cultivo, essa água foi tratada com uma solução de 2% de cloro em água destilada e filtrada por um sistema de filtros de cartucho de celulose, sendo o primeiro cartucho com porosidade de 50,5 e o último com 0,5 μm . No momento da utilização, a água foi desclorada com uma solução 12% de tiosulfato de sódio em água destilada e filtrada com papel de filtro de porosidade de 200 μm . Para verificar a eficácia do processo de descloração, foi utilizado o reagente Clorotest[®] (Labcon). O protocolo da utilização desse reagente se encontra no anexo 1. Verificada a neutralização do excesso de cloro, a água era então utilizada.

A salinidade da água foi padronizada em 15‰ (partes por mil) ou 1,5%. Esta água foi preparada por diluição da água do mar pura (salinidade aproximadamente 30 ‰) com água doce (da torneira). O ajuste foi feito com o auxílio de um refratômetro (Instrutherm RTS-28), e novamente foi utilizado o Clorotest[®], para verificar a quantidade de cloro na água. Se necessário, utilizava-se novamente da solução de tiosulfato de sódio para neutralizar o excesso de cloro. Essa água foi utilizada então para o preparo dos meios de cultura, onde cada erlenmeyer foi preenchido com 1,7 L.

Após o preparo dos meios de cultura, conforme apêndices 1 e 2, os meios eram autoclavados e, após atingirem a temperatura ambiente, eram inoculados. O inóculo foi padronizado em 900.000 células por litro de meio de cultivo e a contagem foi realizada em câmara de Neubauer. As curvas de crescimento obtidas em cada tratamento se encontram no apêndice 3.

4.2 Experimento 1: Delineamento Plackett Burman

Para a primeira série de experimentos de triagem foram utilizados 12 tratamentos. Esse experimento foi realizado seguindo a matriz dada pelo planejamento fatorial Plackett Burman gerado pelo software Statistica 7.0, conforme tabela 2.

Foram testadas as variáveis independentes: concentração de nitrogênio, fósforo, ferro, silício e glicerol. A cada erlenmeyer foi adicionado um volume da solução estoque referente à

concentração -1 ou +1 destes nutrientes, conforme tabela 2, e o restante dos nutrientes, conforme apêndice 2. O glicerol foi utilizado puro e não em solução e, por esse motivo, colocou-se um volume correspondente deste nutriente de forma que as concentrações finais no meio de cultura fossem 0,04 M (+1) e 0,02 M (-1). Essa quantidade de glicerol adicionada foi baseada no trabalho de Cerón García e colaboradores (2000) que testaram a influência de várias concentrações de glicerol no cultivo da *Phaeodactylum tricornutum* no perfil lipídico da microalga.

A tabela 1 mostra detalhadamente a matriz de dados utilizada neste delineamento e a tabela 2 mostra as concentrações correspondentes de cada nutriente para cada nível do planejamento fatorial.

Tabela 1 – Planejamento Plackett-Burmann

Erlenmeyer	X1	X2	X3	X4	X5
	Nitrogênio	Fósforo	Ferro	Silício	Glicerol
1	+1	-1	-1	+1	-1
2	+1	+1	-1	-1	+1
3	+1	+1	+1	-1	-1
4	-1	+1	+1	+1	-1
5	+1	-1	+1	+1	+1
6	-1	+1	-1	+1	+1
7	-1	-1	+1	-1	+1
8	-1	-1	-1	-1	-1
9	+1	+1	+1	+1	+1
10	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0

Tabela 2 - Concentrações dos nutrientes no Meio F/2 Guillard utilizadas nos experimentos

Componente ¹	Concentração	Concentração	Concentração
	(+1)	(-1)	(0)
NaNO ₃	150 mg/L	37,5 mg/L	93,75 mg/L
NaH ₂ PO ₄ . 2H ₂ O	5 mg/L	2,5 mg/L	3,75 mg/L
NaSiO ₃ .9H ₂ O	30 mg/L	15 mg/L	22,5 mg/L
FeCl ₂	0,04 M	0,02 M	0,03 M
Glicerol	5 mL	2,5 mL	3,75 mL

Os valores no nível 0 correspondem à média das concentrações dos níveis +1 e -1. Os outros componentes do meio tiveram suas concentrações mantidas como no meio tradicional.

4.3 Delineamento Composto Central Rotacionado (DCCR):

Após os experimentos de triagem, foi realizado o DCCR com as variáveis nitrogênio, fósforo e glicerol em 5 níveis de concentração, como mostrado na tabela 5. O delineamento obedeceu a matriz de dados apresentada na tabela 3. Os níveis das variáveis foram alterados a partir dos resultados obtidos no delineamento anterior (tabela 4).

Neste experimento utilizou-se os pontos fatoriais (+1 e -1), pontos axiais (+1,68 e -1,68) e os pontos centrais (0). O ponto central foi repetido 4 vezes para estimar o erro experimental.

Tabela 3 – Matriz de dados do DCCR

	X1- Nitrogênio	X2 - Fósforo	X3 - Glicerol
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	-1,68	0	0
10	1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	1,68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0

Tabela 4 – Concentrações dos nutrientes utilizadas nos cultivos em mg/L. O glicerol é apresentado em mL de uma solução com 96% de pureza.

Variável	(+1,68)	(+1)	0	(-1)	(-1,68)
Nitrogênio (mg/L)	337,5	277,5	187,5	97,5	37,5
Fósforo (mg/L)	10	8,2	5,5	2,8	1
Glicerol (mL)	20	16	10	4	0

4.4 Amostragem:

As microalgas foram cultivadas por 15 dias e 350 mL de amostra foram retirados de cada erlenmeyer no 8°, 10°, 12° e 15° dia do cultivo, no delineamento Plackett Burman e no

8° e 15° dia para o DCCR. Desses 350 mL, 150 mL de amostra foram separados para determinação da biomassa seca. O restante foi floculado com NaOH 1 M.

4.5 Floculação

A floculação de 200 mL de meio de cultura foi feita com 1 mL de NaOH 1 M, seguida de homogeneização. Se em até 2 minutos não se observasse floculação, alíquotas de 0,5 mL de NaOH 1 M eram adicionados até que a floculação pudesse ser visualizada. Os recipientes com o material foram deixados por no mínimo 2 horas sob refrigeração para auxiliar no processo de sedimentação da biomassa e ajudar a reduzir o volume do floculado a aproximadamente 10% do volume total. Retirou-se então o sobrenadante por esgotamento com um tubo de PVC e o volume restante foi colocado em tubos de ensaio e centrifugado por 5 minutos a 3000 rpm em temperatura ambiente, na centrífuga Bio Eng 6000. A biomassa no fundo do recipiente foi recuperada, após descartar novamente o sobrenadante, e foi então congelada e liofilizada.

4.6 Biomassa Seca

A determinação da biomassa seca foi feita em triplicata por filtração a vácuo com. Para tanto, 150 mL do meio de cultivo foi separado em alíquotas de 50 mL foram filtradas em papel de filtro quantitativo, faixa azul, de porosidade média 8 µm, com auxílio de uma bomba á vácuo. Os papéis com amostra foram secados em estufa a 60°C até peso constante e foram pesados em balança analítica com precisão de 0,001 gramas.

Para evitar a influência da umidade originalmente presente nos filtros, pesou-se 3 unidades do papel de filtro que foram posteriormente colocados em estufa a 60°C até peso constante. A umidade original do filtro (U) foi calculada pelo peso do papel de filtro antes da estufa (P₂) menos o peso do papel de filtro depois da estufa (P₃), como segue abaixo:

$$U = P_2 - P_3 \quad (Eq. 1)$$

Sendo assim, a biomassa seca em gramas por litro foi calculada conforme a equação abaixo:

$$BS \text{ g / L} = (P_1 - P_2 + U) \cdot 20 \quad (Eq. 2)$$

Onde:

BS g/L = biomassa seca em gramas por litro

P1 – peso do papel de filtro seco + biomassa seca

P2 – peso do papel de filtro com umidade

U - umidade

A dedução de todas as equações utilizadas para os cálculos das variáveis-resposta encontra-se no apêndice 5.

4.7 Determinação da quantidade de lipídios totais

A biomassa liofilizada foi utilizada para determinação da quantidade de lipídios totais. A técnica utilizada para essa determinação foi a de Bligh-Dyer, adaptado de Lourenço (2006). Pesou-se 50 mg de amostra de microalga liofilizada em um tubo de ensaio (tubo 1); adicionou-se 3 mL de uma mistura de clorofórmio:metanol (2:1, v:v) e 10 µL de uma solução de butil-hidroxitolueno – BHT (1% em metanol). A mistura foi sonicada por 3 ciclos de 15 minutos, agitando cada tubo num agitador no intervalo de cada ciclo. Os tubos então foram incubados por 24 h sob refrigeração, protegidos da luz com papel alumínio. Após esse tempo, os tubos foram sonicados novamente por 3 ciclos de 15 min, da mesma forma como citado anteriormente. Para separar o lipídio extraído até então, centrifugou-se os tubos a 3500 rpm por 5 min. O sobrenadante foi recuperado e transferido para outro tubo (tubo 2). Adicionou-se novamente 1,5 mL da mistura clorofórmio:metanol (2:1, v:v) à biomassa sedimentada do tubo 1, centrifugou-se novamente a 3500 rpm por 5 min. Novamente, o sobrenadante foi recuperado e transferido para o tubo 2.

Ao tubo 2, adicionou-se 2 mL de água destilada e 1 mL de clorofórmio, centrifugou-se novamente, nas mesmas condições anteriores. Então, a fase inferior foi recuperada e transferida a um terceiro tubo (tubo 3), previamente pesado (T_1). A fase aquosa, que permaneceu no tubo 2, foi lavada novamente com 1 mL de clorofórmio, centrifugada, e a fase inferior foi transferida ao tubo 3. O tubo 3 foi levado a capela de exaustão, onde permaneceu até que todo o solvente evaporasse. Depois, o tubo foi novamente pesado (T_2). A determinação dos lipídios totais foi feita através da diferença entre os pesos de T_1 e T_2 :

$$\%Lipídios \text{ Totais} = \frac{(T_2 - T_1) * 100 \%}{B} \quad (Eq. 3)$$

onde:

B = biomassa seca pesada em gramas

Para a determinação da quantidade de lipídio em mg/L:

$$Lipídios \text{ mg / L} = \frac{(T_2 - T_1) * C}{B} . 1000 \quad (Eq. 4)$$

onde:

B = biomassa seca pesada em gramas

C = biomassa seca em gramas por litro

4.8 Determinação de Acilgliceróis (AG):

A quantidade de Acilgliceróis (AG) foi determinada pelo método enzimático colorimétrico com o kit *Tryglicerides Liquicolor mono*[®], da Human do Brasil. Esse método baseia-se na hidrólise enzimática dos triacilgliceróis com lipases, utilizando o indicador quinoneimina, formado a partir do peróxido de hidrogênio e 4-aminoantipirina, sob a influência da peroxidase, como segue abaixo:



O extrato lipídico obtido em cada triplicata da etapa anterior foi ressuspenso em 1 mL de clorofórmio e transferido para um eppendorf de 2 mL. Após a evaporação do clorofórmio, esse extrato foi utilizado para a quantificação de AG. A esse extrato foi adicionado 2 mL de etanol absoluto, com agitação até completa dissolução. Dessa solução, 10 µL foram misturados a 1 mL do reagente enzimático. Após incubação de 10 minutos em temperatura ambiente, a intensidade da cor desenvolvida (absorbância) foi lida em espectrofotômetro Femto 700 Plus com comprimento de onda de 500 nm. O procedimento foi repetido para o padrão fornecido pelo fabricante do kit e utilizou-se como branco o reagente

enzimático, sem adição de amostra. O cálculo para a determinação de teor de acilgliceróis segue abaixo:

a) *Porcentagem de acilgliceróis por lipídios totais extraídos:*

$$\%AG / g = \frac{2. (Absam - Absbr)}{5. (Abspad - Absbr). (B). (\%L)} . 100 \% \quad (Eq. 4)$$

onde:

%AG/g = porcentagem de acilgliceróis por lipídios totais extraídos

Absam = absorbância da amostra

Absbr = absorbância do branco

Abspad = absorbância do padrão

B = biomassa seca pesada na determinação de lipídios

% L = percentual de lipídios por grama de biomassa seca

b) *Acilgliceróis em miligramas por litro de meio:*

$$AG \text{ mg} / L = \frac{(Absam - Absbr). (C)}{250. (Abspad - Absbr). (B)} \quad (Eq. 5)$$

onde:

Absam = absorbância da amostra

Absbr = absorbância do branco

Abspad = absorbância do padrão

B = biomassa seca pesada na determinação de lipídios (g)

C = biomassa seca em (g/L)

4.9 Análise Estatística:

As matrizes de dados codificadas, os cálculos de regressão e a geração dos gráficos de superfície foram realizados no software estatístico STATISTICA 7.0.

4.10 Fluxograma de trabalho:

Para facilitar a compreensão, encontra-se abaixo um fluxograma contendo as etapas principais do trabalho.

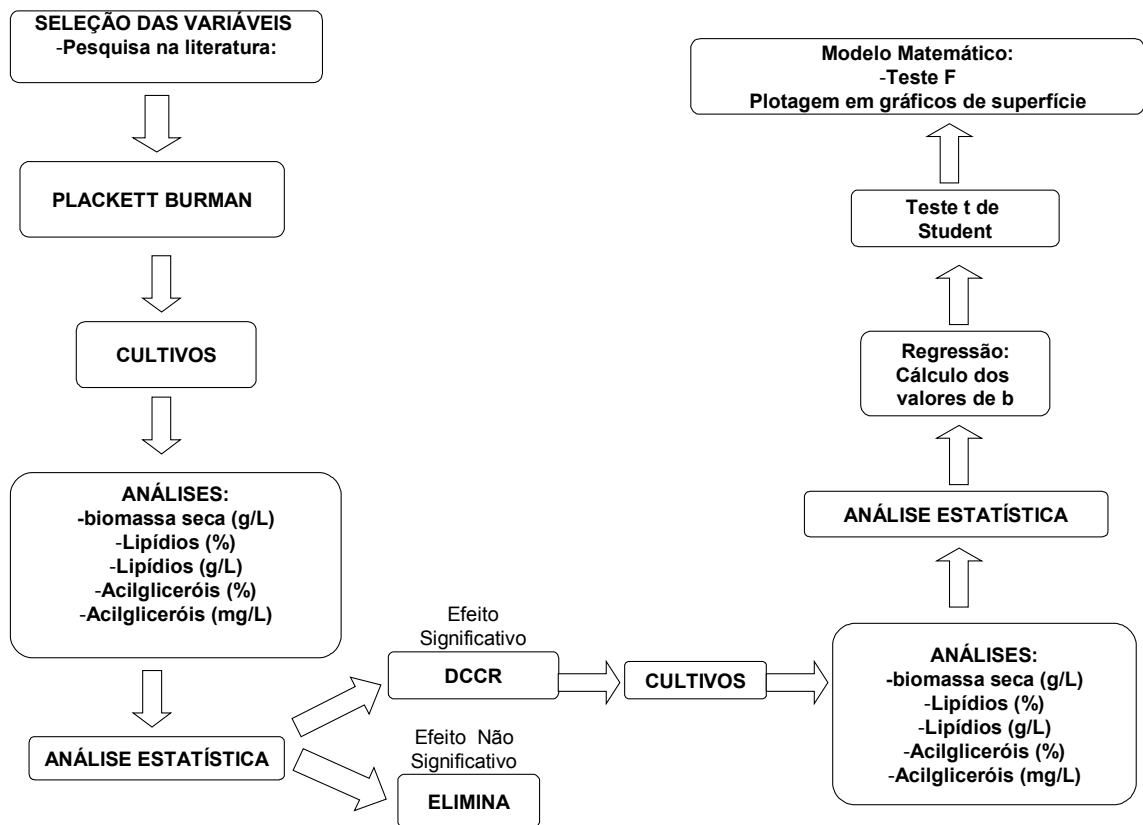


Figura 6 – Fluxograma de Trabalho

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme relatado na literatura, os nutrientes que tinham alguma influência sobre a produção de lipídios eram o nitrogênio, fósforo, ferro e silício e uma fonte orgânica de carbono. Sabendo-se que a microalga *Phaeodactylum tricornutum* tem capacidade de assimilar carbono orgânico (CERÓN-GARCIA et al, 2000), escolheu-se o glicerol como a fonte de carbono por ser um resíduo da fabricação do biodiesel.

Grande parte dos estudos encontrados envolvendo a manipulação nutricional do meio de cultura para microalgas não eram realizados com a *Phaeodactylum tricornutum*, mas com outras diatomáceas. Como as microalgas podem ter uma fisiologia muito diferente uma da outra, optou-se por realizar um estudo inicial de triagem das variáveis selecionadas, para verificar se realmente tinham efeito significativo na produção de lipídios na microalga *Phaeodactylum tricornutum*. Os níveis de concentração de cada variável neste primeiro delineamento foram definidos com base nas concentrações já utilizadas no meio F/2 Guillard.

Após realizada esta triagem inicial, as variáveis que tiveram efeito significativo no delineamento Plackett Burmann foram selecionadas para um segundo delineamento, o DCCR. Este segundo delineamento teve por objetivo verificar qual concentração destas variáveis resultaria nos melhores resultados para as variáveis-resposta, ou seja, o ponto ótimo. Para este segundo delineamento, os níveis de concentração dos nutrientes foram definidos conforme a tendência de aumento ou diminuição que as variáveis apresentaram no primeiro teste.

5.1 Delineamento Plackett Burmann

A tabela 5 mostra as variáveis independentes e variáveis-resposta analisadas neste primeiro delineamento, o *screening* Plackett Burmann.

Tabela 5 - Variáveis-independentes e variáveis resposta utilizadas no delineamento Plackett Burmann.

Variáveis independentes	Variáveis-resposta
Nitrogênio	Biomassa Seca
Fósforo	% Lipídios por grama de biomassa seca
Ferro	Gramas de lipídios por litro de meio
Silício	% Acilgliceróis por grama de biomassa seca
Glicerol	Gramas de acilgliceróis por litro de meio

Este teste mostrou que apenas as variáveis nitrogênio e fósforo tiveram algum efeito significativo e esse efeito significativo só ocorreu em algumas das variáveis-resposta

estudadas. Os resultados referentes às variáveis-resposta deste teste podem ser encontrados no apêndice 4.

O efeito de uma variável independente sobre a variável-resposta é representado pelos valores de b na equação de regressão não linear:

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^5 b_i X_i + \sum_{i < j}^5 b_{ij} X_i X_j + \sum_{j=1}^5 b_{jj} X_j^2$$

A significância estatística dos coeficientes da equação é determinada pelo teste t de Student, que fornece o parâmetro p -valor, ou nível descritivo do teste. O p -valor representa a probabilidade de se cometer um erro do tipo I quando se realiza um teste de hipótese, ou seja, a probabilidade de se rejeitar uma hipótese quando ela é verdadeira. Para considerar que uma variável independente tem um efeito significativo sobre uma variável resposta, o resultado do p -valor obtido para o b correspondente àquela variável, deve ser menor do que o nível de significância pré-determinado para o teste. O mesmo vale para os resultados de b que representam a interação entre as variáveis (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

Em delineamentos de *screening*, como o Plackett Burmann, um nível de significância de 0,1 (ou seja, 10% probabilidade de um erro tipo I é considerado apropriado. Nos outros tipos de delineamentos considera-se um bom nível de significância um valor de 0,05. Portanto, para aceitar o valor de b como significativo, a probabilidade deste parâmetro estar errado, ou seja, seu p -valor, deve ser menor do que 0,1 ou 0,05 (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

Na tabela 6, pode-se visualizar as variáveis independentes que tiveram efeitos significativos sobre as variáveis-resposta. Os demais resultados de p -valor podem ser encontrados no apêndice 4.

Tabela 6 - *P-valores* das variáveis independentes que apresentaram um *p-valor* menor do que 0,1 em diferentes dias de coleta de amostra.

Variável Independente	Variável-Resposta	<i>p-valor</i>	Dia de coleta de amostra
		0,041	8°
Fósforo	Biomassa Seca	0,083	10°
		0,058	12°
		0,059	15
	Miligramas de Lipídios por Litro de meio	0,080	15°
Nitrogênio	Miligramas de Lipídios por Litro de meio	0,093	8°
	Miligramas Acilgliceróis por Litro de meio	0,086	8°
	Miligramas Acilgliceróis por Litro de meio	0,055	12°
	Miligramas Acilgliceróis por Litro de meio	0,069	15°

A variável fósforo teve um efeito significativo no valor da biomassa seca em todos os dias analisados, enquanto a variável nitrogênio foi significativa apenas para miligramas de lipídios por litro de meio em 8 dias. A partir deste resultado, selecionaram-se as variáveis nitrogênio e fósforo para os próximos experimentos.

É importante ressaltar que as demais variáveis não tiveram efeito estatisticamente significativo nas concentrações utilizadas nesta triagem. A variável glicerol também foi selecionada para os próximos experimentos, apesar de não ter tido efeito significativo sobre nenhuma das variáveis-resposta, pois suspeitou-se que o intervalo de concentração utilizada desse nutriente não foi suficiente para ter um efeito significativo. Outra razão que motivou a escolha do glicerol foi a suspeita de que a alta temperatura do processo de autoclavagem dos meios realizada antes de inocular tenha degradado o glicerol e deixado este nutriente indisponível para a microalga. Os experimentos posteriores foram realizados colocando-se o glicerol após a autoclavagem dos meios.

Optou-se também por selecionar o 8º e o 15º dia de crescimento para tirar as amostras em todos os estudos posteriores para reduzir o número de amostras e por sempre terem apresentado, respectivamente, o menor e o maior valor obtido para todas as variáveis resposta.

5.2 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Uma vez que as variáveis que apresentaram efeito significativo no delineamento Plackett Burmann foram selecionadas, o próximo delineamento realizado foi o DCCR. Este delineamento produz resultados mais completos, passíveis de serem representados por um modelo matemático com mais precisão do que o delineamento anterior por utilizar mais níveis e testar um maior número de combinações entre os fatores. Neste planejamento foi utilizado um nível de significância de 0,05.

Neste experimento utilizou-se 14 tratamentos diferentes mais 4 repetições do ponto central. As variáveis independentes e variáveis resposta determinadas nesta série de experimentos encontram-se na tabela 7.

Tabela 7 - Variáveis independentes e variáveis resposta utilizadas no Delineamento Composto Central Rotacional

Variáveis Independentes	Variáveis Resposta
Nitrogênio	Biomassa Seca
	Produtividade Celular
Fósforo	% Lipídios por grama de biomassa seca
	Gramas de lipídios por litro de meio
Glicerol	% Acilgliceróis por grama de biomassa seca
	Gramas de acilgliceróis por litro de meio

5.2.1 Biomassa Seca

Para a produção de biodiesel é necessário maximizar a quantidade de lipídeos produzidos por litro de meio de cultivo. Isso pode ser calculado em função da concentração de biomassa em gramas por litro de meio e do conteúdo de lipídios por grama de biomassa seca. Da mesma forma, a quantidade de acilgliceróis por litro de meio de cultura é uma função da concentração da biomassa seca.

Os valores de biomassa seca obtidos em 8 e 15 dias de cultivo, bem como os valores preditos, encontram-se na tabela 8. Os dados são expressos em média \pm erro padrão da média.

Tabela 8 – Valores de biomassa seca em g/L de meio de cultura.

	Variáveis independentes	8 dias	15 dias
--	-------------------------	--------	---------

	Nitrogênio	Fósforo	Glicerol	Y Valores Observados (g/L)	\hat{Y} Valores preditos (g/L)	Y Valores Observados (g/L)	\hat{Y} Valores preditos (g/L)
1	-1	-1	-1	0,46	0,43	0,58	0,58
2	1	-1	-1	0,44	0,43	0,85	0,69
3	-1	1	-1	0,84	0,74	1,28	1,07
4	1	1	-1	0,95	0,94	1,50	1,50
5	-1	-1	1	0,55	0,51	0,94	0,76
6	1	-1	1	0,57	0,62	0,78	0,81
7	-1	1	1	0,83	0,79	1,23	1,20
8	1	1	1	1,13	1,10	1,73	1,56
9	-1,68	0	0	0,50	0,60	0,68	0,85
10	1,68	0	0	0,87	0,86	1,15	1,24
11	0	-1,68	0	0,37	0,37	0,45	0,54
12	0	1,68	0	0,94	1,03	1,43	1,59
13	0	0	-1,68	0,49	0,56	0,70	0,84
14	0	0	1,68	0,75	0,77	0,92	1,04
15	0	0	0	0,76	0,78	0,92	0,96
16	0	0	0	0,75	0,78	0,96	0,96
17	0	0	0	0,84	0,78	0,95	0,96
18	0	0	0	0,78	0,78	1,06	0,96

Os valores destacados em negrito na tabela 8 correspondem aos melhores resultados em biomassa seca e correspondem àqueles cultivos nos quais há um grande número de células.

As variáveis que apresentaram um efeito significativo ($p < 0,05$) sobre a biomassa seca foram apenas os termos lineares do nitrogênio, do fósforo e do glicerol sendo que o fósforo apresentou o efeito mais significativo. As demais variáveis, termos quadráticos e interações, não foram significativas. Para o décimo quinto dia, foram significativos somente os termos lineares das variáveis fósforo e nitrogênio.

Os valores preditos para a biomassa seca dos cultivos com 8 dias foram ajustados pela equação:

$$\hat{Y} = 0,781 + 0,151 \cdot X_1 + 0,393 \cdot X_2 + 0,121 \cdot X_3 + 0,036 \cdot X_1^2 + 0,057 \cdot X_2^2 + 0,081 \cdot X_3^2 + 0,102 \cdot X_1 \cdot X_2 + 0,057 \cdot X_1 \cdot X_3 + 0,014 \cdot X_2 \cdot X_3$$

(Eq. 7)

O R^2 , o coeficiente de determinação, para a variável biomassa seca foi de 0,94, indicando que a porcentagem de variação explicada pelo modelo é de 94%. Para avaliar a qualidade do ajuste do modelo, compara-se a variação explicada com a variação não

explicada através do teste F de Snedecor. Esses dois componentes da variação tem k e $(n-k-1)$ graus de liberdade, respectivamente, sendo k o número de parâmetros de regressão e n o tamanho da amostra. O cálculo resulta em um F calculado (F_{calc}) como mostra a equação abaixo, que é comparado com um valor de F tabelado (F_{tab}) (GONZÁLES, 2009).

$$F_{\text{calc}_{k;n-k-1;0,05}} = \frac{s_a^2}{s_b^2} \quad (\text{Eq. 8})$$

onde:

s_a^2 : quadrado médio dos valores preditos

s_b^2 : quadrado médio do resíduo

Nas tabelas de análise de variância que seguem abaixo, o valor de F_{tab} é selecionado relacionando entre os valores de F para os graus de liberdade da regressão e os graus de liberdade dos resíduos no nível de significância estipulado (0,05). Se o F_{calc} é superior ao F_{tab} rejeita-se a hipótese nula de baixa qualidade da regressão e aprova-se a hipótese alternativa de uma regressão adequada. Nessa condição pode-se plotar um gráfico de superfície de resposta (GONZÁLES, 2009).

Para a variável biomassa seca, coletada em 8 dias, o F_{calc} (13,5818) foi superior ao F_{tab} (3,23) e o p -valor para o modelo foi menor do que 0,00001, indicando uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos e que este modelo é significativo (tabela 10).

Tabela 1 - Análise da variância para os resultados de biomassa seca obtidos em 8 e 15 dias de cultivo.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados		Quadrado Médio		F-calc		p-valor	
		8 dias	15 dias	8 dias	15 dias	8 dias	15 dias	8 dias	15 dias
Regressão	9	0,7107	1,637	0,0789	0,0789	13,5818	5,9489	<0,00001	<0,00001
Resíduos	8	0,0465	0,2446	0,0058	0,0058				
Total	17	0,7572	1,8816						

$$R^2_{8\text{dias}} = 0,94$$

$$R^2_{15\text{dias}} = 0,87$$

$$F_{\text{tab}_{9;8;0,05}} = 3,23$$

Para 15 dias, os resultados obtidos tiveram um ajuste regular conforme equação abaixo, com um R^2 de 0,87. Os dados da análise de variância encontram-se na tabela 10. O F_{calc} é um pouco maior que o F_{tab} , mostrando que há concordância entre os dados experimentais e os dados previstos.

$$\begin{aligned} \bar{Y} = & 0,961 + 0,237 \cdot X_1 + 0,062 \cdot X_2 + 0,123 \cdot X_3 + 0,0596 X_1^2 + 0,074 \cdot X_2^2 - 0,015 X_3^2 \\ & + 0,153 \cdot X_1 \cdot X_2 - 0,033 \cdot X_1 \cdot X_3 - 0,029 X_2 \cdot X_3 \end{aligned} \quad (Eq. 9)$$

Pode-se observar que os valores da biomassa seca tiveram um aumento considerável entre o 8º e o 15º dia para a maioria dos tratamentos. Apesar dos cultivos já se encontrarem na fase estacionária no 8º dia (ver curvas de crescimento no apêndice 3), onde já não há mais incremento no número de células, alguns valores de biomassa para o mesmo tratamento entre o 8º e o 15º chegaram a dobrar como mostrado no gráfico 1. Tal fato está diretamente relacionado com o acúmulo lipídico na célula, que será abordado mais adiante.

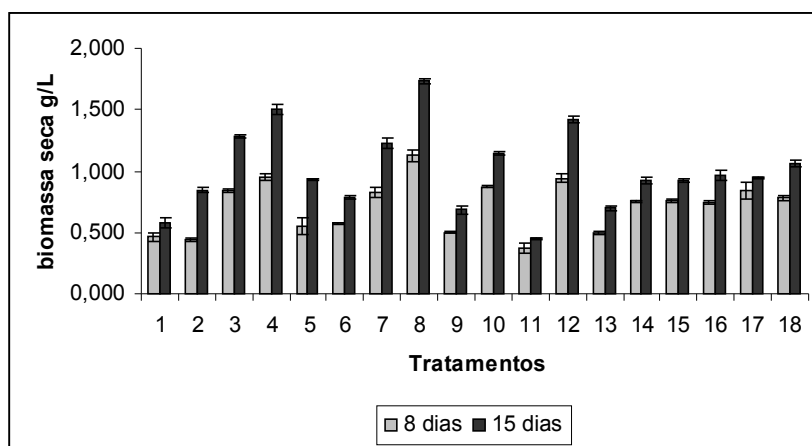


Gráfico 1 - Aumento da biomassa seca (mg/L) em 8 e 15 dias. Os resultados plotados são referentes às médias do experimento obtido em triplicata \pm erro padrão da média.

O tratamento 8 foi o que apresentou melhores resultados em biomassa seca, aumentando em 53% sua biomassa do 8º para o 15º dia, chegando a quase 1,73 g/L de biomassa seca com 15 dias de cultivo.

O gráfico 2 mostra que, para a variável dependente biomassa seca em 8 dias, as concentrações mais altas de glicerol foram as que resultaram em melhores valores de biomassa seca indicando que experimentos futuros podem ter melhores resultados em biomassa seca aumentando-se ainda mais os níveis desse nutriente. Os resultados da biomassa seca mostram uma tendência ao aumento quanto maiores forem as concentrações de fósforo ou nitrogênio adicionadas (gráficos 3 e 4).

Os gráficos de superfície mostram que a resposta para a biomassa seca será maior quanto maior forem as concentrações adicionadas dos nutrientes testados.

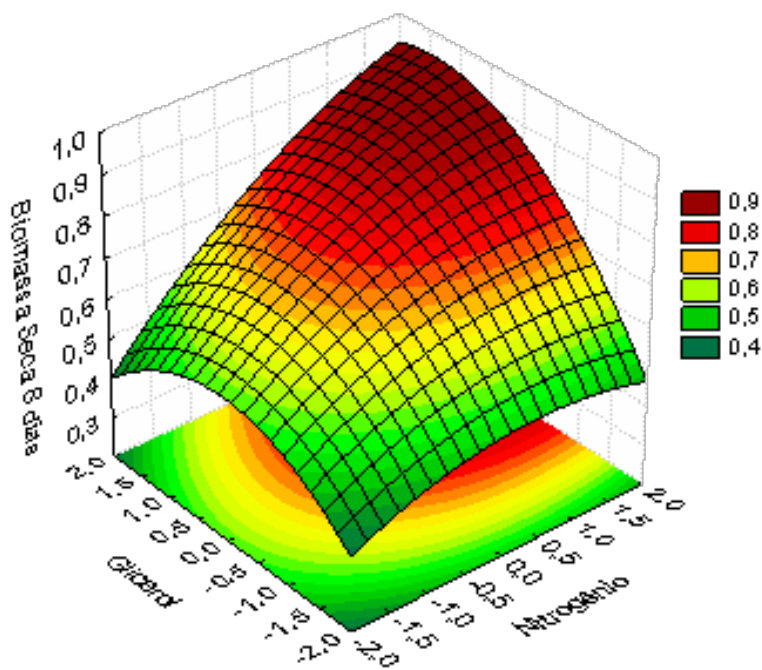


Gráfico 2 - Superfície de resposta para a variável dependente biomassa seca em 8 dias de cultivo mostrando o efeito do nitrogênio e do glicerol. Variável fósforo mantida em nível 0.

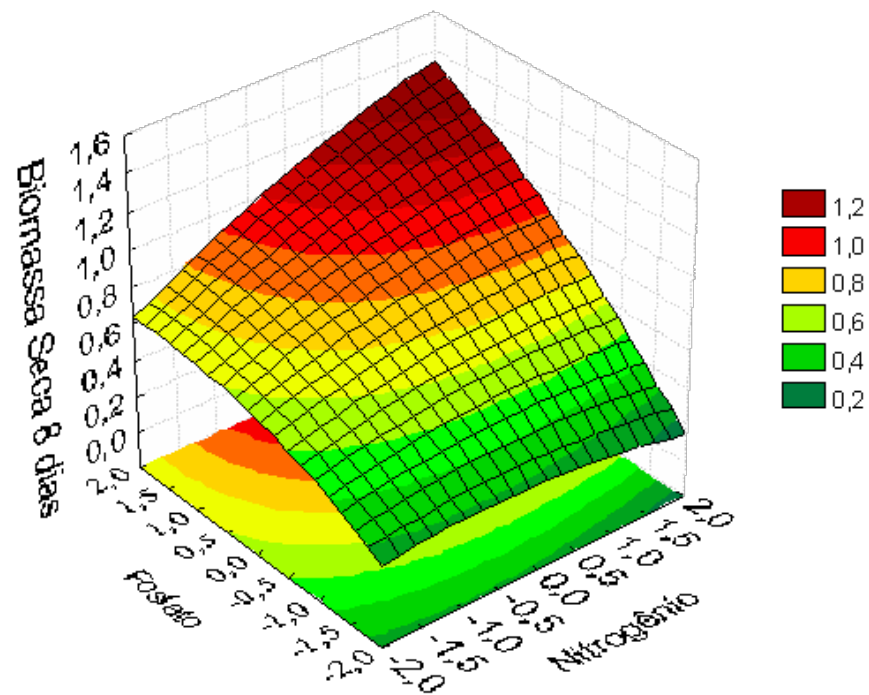


Gráfico 3 – Superfície de resposta para a variável dependente biomassa seca em 8 dias de cultivo mostrando o efeito do nitrogênio e do fósforo. Variável glicerol mantida em nível 0.

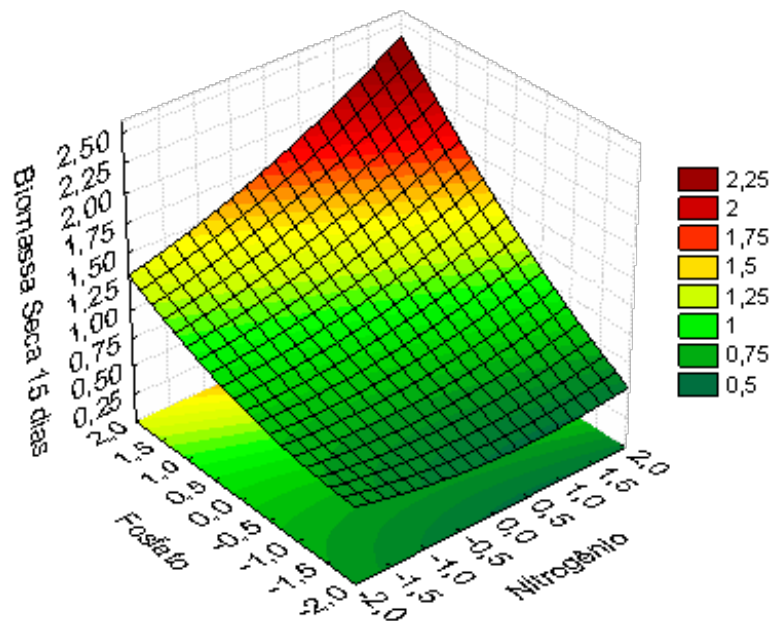


Gráfico 4 – Superfície de resposta para a variável dependente biomassa seca em 15 dias de cultivo. Variável glicerol mantida em nível 0.

Sugere-se que o meio já se encontra em situação de depleção de nutrientes, gerado pelo grande número de células e esgotamento das fontes de nitrogênio, fósforo e carbono no meio de cultura e que os nutrientes deveriam ter suas concentrações aumentadas.

Através desses gráficos, fica claro um efeito bastante significativo do fósforo sobre a biomassa seca e um efeito razoável do nitrogênio e do glicerol, ou seja, neste estudo, nas concentrações utilizadas, o crescimento celular esteve mais relacionado à concentração de fósforo no meio mais do que dos outros nutrientes.

Kaixian e Borowitzka (1982), ao estudar o efeito do nitrogênio sobre a composição da *Phaeodactylum tricornutum*, obtiveram resultados inferiores em condições parecidas com este estudo: cultivo em erlenmeyers de 2 L, meio de cultura F/2 Guillard, aeração com ar atmosférico, sem fotoperíodo, concentração de nitrogênio de 0,88 mM e concentração de fósforo (NaHPO_4) de 10 mg/L. Após 10 dias de cultivo, obtiveram uma biomassa seca de 0,615 g/L. Na menor concentração de nitrogênio utilizada neste trabalho (0,4 mM), e numa concentração de fósforo de 5,5 mg/L, equivalentes à metade das concentrações de nitrogênio e fósforo utilizada por estes pesquisadores, foi obtida uma biomassa de 0,5 g/L (tratamento 9). Ou seja, com a metade da concentração dos nutrientes, obteve-se praticamente a mesma biomassa. Os melhores resultados deste trabalho para este tratamento podem ser decorrentes da complementação da fonte de carbono com o uso do glicerol.

Yongmanitchai e Ward (1991) obtiveram melhores resultados do que este estudo, cultivando a microalga *Phaeodactylum tricornutum* em meio Mann & Myers, em tanques, com fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 de escuro, com diferentes fontes de nitrogênio por 7 dias, com o intuito de produzir ácidos graxos polinsaturados (EPA – ácido eicosapentanoico). Obtiveram uma biomassa de 1,4 g/L utilizando NaNO_3 (0,25 g/L), mesma fonte de nitrogênio utilizada neste trabalho, e 3,0 g/L de biomassa utilizando uréia numa concentração de 0,7 g/L de meio, o que leva a crer que em trabalhos posteriores deverão ser testadas outras fontes de nitrogênio.

5.2.2 Lipídios:

O percentual de lipídios por grama de biomassa teve uma variação significativa entre o 8º e o 15º dia de cultivo e também para os diferentes tratamentos. A tabela 11 mostra esses resultados.

Tabela 2 – Percentual de lipídios por grama de biomassa seca em 8 e 15 dias de cultivo.

	Variáveis independentes			8 dias		15 dias	
	Nitrogênio	Fósforo	Glicerol	% Lipídios Observada	% Lipídios Predita	% Lipídios Observada	% Lipídios Predita
1	-1	-1	-1	11,84	12,46	19,08	20,24
2	1	-1	-1	13,81	12,74	22,07	20,48
3	-1	1	-1	17,47	16,37	26,42	24,52

4	1	1	-1	15,95	15,16	18,01	18,68
5	-1	-1	1	13,74	13,75	20,75	19,39
6	1	-1	1	13,01	13,34	20,76	21,97
7	-1	1	1	13,84	14,14	21,90	22,80
8	1	1	1	13,62	12,23	21,14	19,29
9	-1,68	0	0	18,60	18,33	23,62	24,01
10	1,68	0	0	15,59	16,96	20,69	21,28
11	0	-1,68	0	10,77	10,46	17,32	17,33
12	0	1,68	0	11,41	12,81	17,72	18,68
13	0	0	-1,68	11,56	12,58	21,68	22,33
14	0	0	1,68	11,12	11,20	21,81	22,14
15	0	0	0	10,98	12,91	20,55	21,59
16	0	0	0	13,57	12,91	21,24	21,59
17	0	0	0	14,06	12,91	21,85	21,59
18	0	0	0	13,24	12,91	22,89	21,59

Com o passar dos dias de cultivo, a tendência é a microalga apresentar um aumento no percentual lipídico, sendo que, neste estudo, todos os tratamentos promoveram um aumento de pelo menos 20% entre o 8º e o 15º dias. Esse resultado comprova que o aumento da biomassa seca apresentado nesse período foi devido ao acúmulo lipídico na célula, como mostra o gráfico 5 .

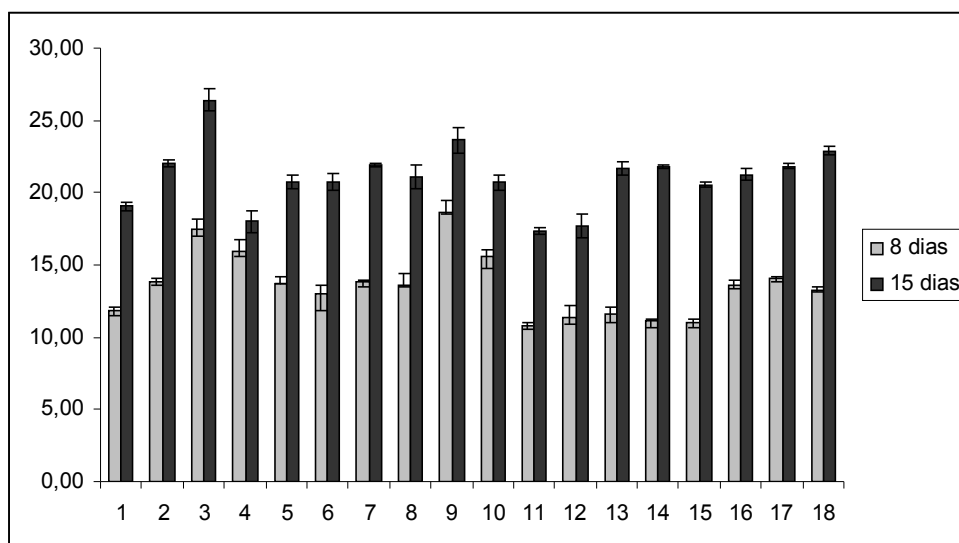


Gráfico 5 - Aumento do percentual lipídico por grama de biomassa seca em 8 e 15 dias. Os resultados plotados são referentes às médias do experimento obtido em triplicata \pm erro padrão da média.

Considerando que os maiores valores para o percentual de lipídios foram obtidos no 15º dia, somente serão analisados os resultados referentes a este ponto.

O tratamento 3, com nitrogênio no nível -1, fósforo 1 e glicerol -1, foi o que apresentou um maior percentual de lipídios por grama de biomassa seca, chegando a 26,4% no 15º dia.

As variáveis que apresentaram maior efeito sobre o percentual de lipídios em 15 dias foram o termo quadrático do fósforo (efeito -2,538 e $p = 0,0223$) e a interação entre os termos lineares do nitrogênio e fósforo (efeito -3,0439 e $p = 0,0271$). Todos os outros termos não tiveram efeitos significativos (apêndice 7).

Para 15 dias, a equação não se ajustou bem aos resultados (equação 10). A análise de variância (tabela 12) mostrou que somente 75% da variação é explicada pelo modelo matemático. O F_{calc} foi de 2,65, bem inferior ao F_{tab} de 3,23, ao nível de significância de 0,05, indicando um ajuste fraco aos dados. Este modelo não pode ser utilizado para inferir valores confiáveis ao percentual de lipídios, nem para produzir uma superfície de resposta.

$$\hat{Y} = 21,590 - 1,629 \cdot X_1 + 0,803 \cdot X_2 - 0,117 \cdot X_3 + 0,746 \cdot X_1^2 - 2,538 \cdot X_2^2 + 0,456 \cdot X_3^2 - 3,044 \cdot X_1 \cdot X_2 + 1,165 \cdot X_1 \cdot X_3 - 0,438 \cdot X_2 \cdot X_3 \quad (\text{Eq. 10})$$

Tabela 3 – Análise da variância para os resultados de % de lipídios por grama de biomassa seca obtidos em 15 dias de cultivo.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado Médio	F
		15 dias	15 dias	15 dias
Regressão	9	60,6	6,73	2,65
Resíduos	8	20,36	2,55	
Total	17	80,97		

$$R^2_{15\text{dias}} = 0,75 \quad F_{\text{tab}9;8;0,05} = 3,23$$

A variação entre os resultados dos tratamentos foi pequena enquanto o erro determinado pelas repetições do ponto central foi relativamente grande, o que pode ter contribuído para a falta de ajuste do modelo aos dados tornando-se difícil distinguir se as variações ao redor da média são devidas a esse erro ou são um efeito da própria variável independente. Esta variação relativamente grande entre as replicatas do ponto central não ocorreu com a variável biomassa seca.

Embora todos os cuidados tenham sido tomados para que o erro experimental fosse minimizado, podem ter sido fontes de erros experimentais neste estudo: (a) a variação de pH nos cultivos devido a eventuais diferenças na vazão do ar atmosférico entre um tratamento e outro. Para diminuir esse erro experimental, sugere-se que sejam instalados sistemas de

controle da vazão de ar e pH do meio; e (b) diferenças na intensidade luminosa recebida por cada erlenmeyer, seja pela distância entre o frasco até a lâmpada ou por pontos de opacidade no vidro. A silício forma depósitos no vidro dos recipientes de cultivo com o passar do tempo, muito difíceis de serem removidos, deixando o vidro opaco. Visto que estes recipientes devem estar o mais transparentes possíveis, sugere-se que nesse tipo de estudo sejam utilizados recipientes sempre sem acúmulo de silício, do mesmo tamanho e com a mesma espessura do vidro.

Os resultados obtidos em 15 dias neste trabalho são condizentes com o percentual lipídico encontrando na literatura, que varia entre 11% a 28%. Reboloso-Fuentes e colaboradores (2001) obtiveram valores entre 16 e 18% de lipídios quando cultivaram a microalga *Phaeodactylum tricornutum* em fotobiorreator, com fotoperíodo de 10 horas, a 20°C, em meio Mann & Myers. Os pesquisadores associam o percentual lipídico ao tempo em que a alga permaneceu no cultivo antes das análises: quanto mais tempo a alga permanece no fotobiorreator, maior a quantidade de lipídios formados, ou seja, o conteúdo lipídico aumentou ao longo do cultivo. Cerón-García e colaboradores (2000) cultivaram essa microalga em tanques, suplementando o meio de cultura com 0,1 M de glicerol e obtiveram aproximadamente 17% de lipídios. Kaixian e Borowitzka (1992) obtiveram 28% cultivando a microalga em erlenmeyers por 9 dias utilizando uma intensidade luminosa aproximadamente duas vezes maior que a utilizada neste experimento.

O percentual de lipídio é um bom parâmetro para avaliar o desempenho da microalga na produção de lipídios, mas não leva em consideração a contagem celular no meio. Não é desejável que a microalga tenha uma boa produção de lipídios em porcentagem mas um valor baixo de biomassa seca. Por exemplo, o tratamento 9 apresenta um bom percentual de lipídios tanto em 8 (18,6%) como em 15 dias (23,62%), mas sua biomassa seca em 15 dias é de apenas 0,68 g/L, enquanto o tratamento 4 apresenta apenas 18% de lipídios, mas 1,5 g/L de biomassa seca. É necessário que a microalga produza muita biomassa e seja rica em lipídios para que a produção de biodiesel seja economicamente viável. Por isso, um parâmetro mais adequado para se avaliar o desempenho da microalga seria a quantidade de lipídios em miligramas por litro de meio de cultura, como mostra a tabela 13.

Tabela 4 – Miligramas de lipídios por litro de meio de cultura em 8 e 15 dias de cultivo

Variáveis Independentes			8 dias		15 dias	
Nitrogênio	Fósforo	Glicero I	Lipídios mg/L Observado	Lipídios mg/L Predito	Lipídios mg/L Observado	Lipídios mg/L Predito

1	-1	-1	-1	54,6	56,4	111,2	123,3
2	1	-1	-1	60,8	56,3	186,7	142,0
3	-1	1	-1	147,0	112,1	338,3	265,3
4	1	1	-1	151,8	135,9	270,1	275,6
5	-1	-1	1	85,5	79,6	194,1	141,8
6	1	-1	1	74,7	87,9	164,9	191,1
7	-1	1	1	115,1	97,9	268,1	266,0
8	1	1	1	153,7	130,1	365,9	306,9
9	-1,68	0	0	94,0	117,0	161,7	207,8
10	1,68	0	0	136,2	144,0	237,6	257,9
11	0	-1,68	0	40,3	27,1	77,7	90,1
12	0	1,68	0	65,2	109,3	252,7	306,6
13	0	0	-1,68	57,3	78,7	151,7	188,7
14	0	0	1,68	83,8	93,3	201,1	230,5
15	0	0	0	83,5	100,6	189,3	207,8
16	0	0	0	101,8	100,6	203,9	207,8
17	0	0	0	118,7	100,6	207,3	207,8
18	0	0	0	103,8	100,6	242,4	207,8

A microalga *Phaeodactylum tricornutum* mostrou um aumento significativo na concentração de lipídios por litro de meio do 8º para o 15º dia. Todos os tratamentos no mínimo dobraram a produção de lipídios sendo que o tratamento 8 apresentou um dos melhores resultados. A quantidade de lipídios totais desse tratamento passou de 153,7 mg/L no 8º dia para 365,9 mg/L no 15º dia, o que representa um aumento de 138%. Para esta variável-resposta serão analisados os resultados de 15 dias de cultivo, pois são os que apresentam maior valor de miligramas de lipídios por litro de meio (gráfico 6).

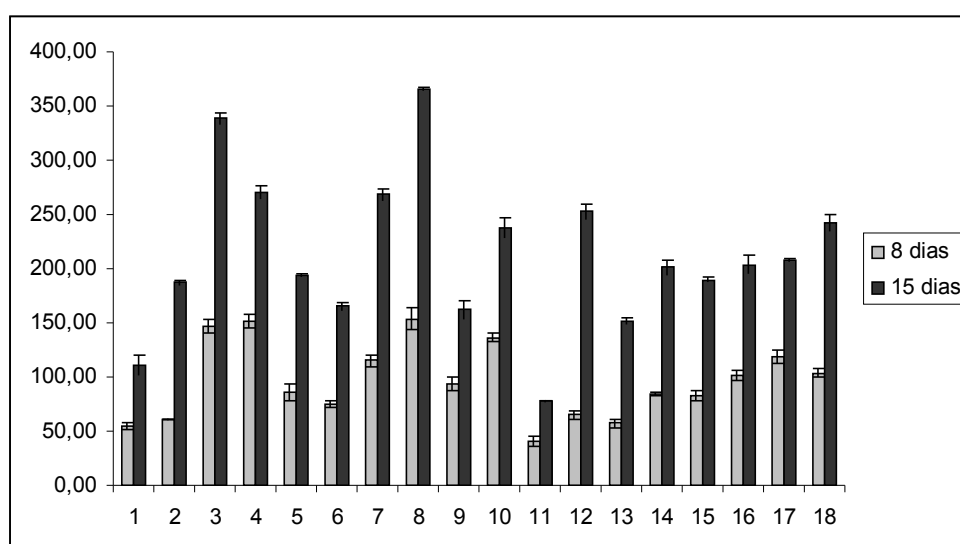


Gráfico 6 – Aumento da quantidade de lipídios em gramas por litro de meio de cultura entre 8 e 15 dias. Os resultados plotados são referentes às médias do experimento obtido em triplicata \pm erro padrão da média.

A variável que apresentou efeito mais significativo em 15 dias, foi o termo linear do fósforo (efeito 128,90, $p = 0,002$).

O modelo matemático não se ajustou bem aos dados experimentais, assim como para a variável % lipídios por grama de biomassa, com um R^2 de apenas 0,72 para 15 dias. O F_{calc} foi inferior ao F_{tab} , indicando falta de ajuste, ou seja, a equação obtida (equação 11) não pode ser utilizada para estimar valores das variáveis independentes que mostrem resultados confiáveis para a variável resposta, nem para geração de gráficos de superfície. Os dados de análise de variância podem ser visualizados na tabela 14.

$$\hat{Y} = 207,775 - 29,822 \cdot X_1 + 128,899 \cdot X_2 + 17,774 \cdot X_3 - 6,655 \cdot X_1^2 + 24,876 \cdot X_2^2 + 1,323 \cdot X_3^2 - 4,193 \cdot X_1 \cdot X_2 + 15,314 \cdot X_1 \cdot X_3 - 8,903 \cdot X_2 \cdot X_3$$

(Eq. 11)

Tabela 5 – Análise da variância para os resultados de biomassa seca obtidos em 8 e 15 dias de cultivo.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado Médio	F
		15 dias	15 dias	15 dias
Regressão	9	63835,58	7092,84	2,38
Resíduos	8	23809,53	2976,19	
Total	17	87645,11		

$$R^2_{15\text{dias}} = 0,72 \quad F_{\text{tab}9;8;0,05} = 3,23$$

Nas concentrações estudadas, o nitrogênio não teve efeito estatisticamente significativo nessa variável. Os valores obtidos para a variável miligramas de lipídios por litro de meio de cultura, nesse caso, foram mais influenciados pela quantidade de biomassa produzida, já que esses valores são calculados em função da biomassa seca, do que pela concentração de nitrogênio. Em outras palavras, uma maior quantidade de lipídios foi obtida para o tratamento que teve o maior número de células e que, conseqüentemente, produziu mais lipídios. O glicerol também não teve grande influência na quantidade de lipídios produzidos nas concentrações utilizadas neste estudo.

5.2.3 Acilgliceróis

Uma vez que a metodologia utilizada neste estudo para a obtenção de lipídios extrai não somente acilgliceróis como também outras moléculas apolares, a determinação de acilgliceróis torna-se bastante interessante, já que são os mono, di e triacilgliceróis que serão convertidos posteriormente em biodiesel, através da reação de transesterificação.

Os acilgliceróis foram determinados em percentual com relação à quantidade total de lipídios extraídos e em miligramas por litro de meio de cultura, em 8 e 15 dias, sendo esta última determinação um parâmetro muito importante como um indicativo do rendimento de lipídios utilizáveis para a produção de biodiesel.

Há um erro importante associado à determinação de acilgliceróis. Alguns tratamentos tiveram valores superiores a 100% de acilgliceróis em relação aos lipídios totais extraídos, não podendo ser considerados como quantitativamente corretos. Isso pode ser explicado pelas diferentes metodologias utilizadas para a determinação da biomassa seca e porcentagem de lipídios totais e para determinação de acilgliceróis.

Para a determinação de biomassa seca e percentual de lipídios utilizou-se uma metodologia gravimétrica, na qual o resultado é dado pelo peso final de um recipiente de massa conhecida que contém o analito. Para a determinação de acilgliceróis a técnica utilizada foi enzimática-colorimétrica, na qual se mede a quantidade de glicerol formado em mols através de uma reação enzimática que resulta num composto colorido e é lido por espectrofotometria. Não se pode comparar, nesse caso, valores obtidos de duas técnicas com princípios completamente diferentes sem um método adequado de calibração da técnica enzimática-colorimétrica que permita relacionar os dois resultados.

Por exemplo (figura 7), na técnica gravimétrica determina-se a quantidade de lipídios de acordo com o peso resultante no frasco após evaporação do solvente, ou seja, ácidos graxos de cadeia mais longa pesam mais e influenciam mais fortemente no resultado, assim como triacilgliceróis pesam mais que diacilgliceróis. Para a técnica enzimática-colorimétrica, não faz diferença se os ácidos graxos que compõem esse acilglicerol tiverem cadeias mais longas ou mais curtas, o que interferiria no peso total do lipídio, ou ainda se esse lipídio é um mono, di ou triacilglicerol. Na técnica enzimática colorimétrica, determina-se a quantidade de glicerol formado após a quebra da molécula do acilglicerol.

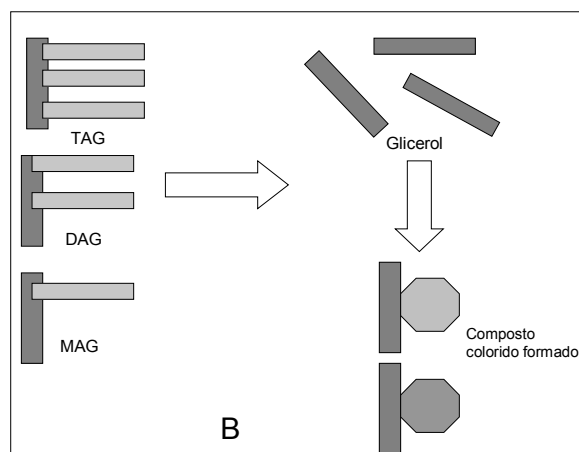
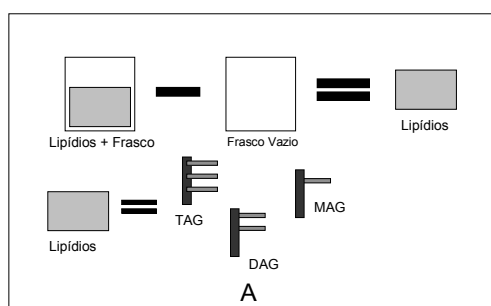


Figura 7 – Diferenças entre as técnicas gravimétrica (A) e enzimática-colorimétrica (B). TAG – triacilglicerol, DAG – diacilglicerol, MAG – monoacilglicerol.

Se o padrão utilizado na análise fosse um padrão feito de óleo dessa microalga, com composição já determinada por GC-MS, não haveria problema de incompatibilidade entre as duas técnicas. Mas como não havia disponibilidade desse óleo neste estudo, o padrão que foi utilizado na análise foi o fornecido pelo fabricante do reagente, próprio para a determinação de acilgliceróis no sangue. Por essa razão, não se pode considerar os valores encontrados para acilgliceróis como quantitativamente corretos, mas podemos considerá-los, de forma qualitativa, para fins de comparação entre um tratamento e outro, ou seja, pode-se afirmar somente que uma amostra possui mais ou menos acilgliceróis que outra. Para estabelecer os valores e a composição dos acilgliceróis para o óleo dessa microalga com precisão, deve-se utilizar técnicas como a espectrometria de massa acoplada a técnicas cromatográficas.

Todos os tratamentos apresentaram altos percentuais de acilgliceróis por lipídios totais extraídos em 8 dias de cultivo e, com o passar dos dias, essa quantidade só aumentou (gráfico 7).

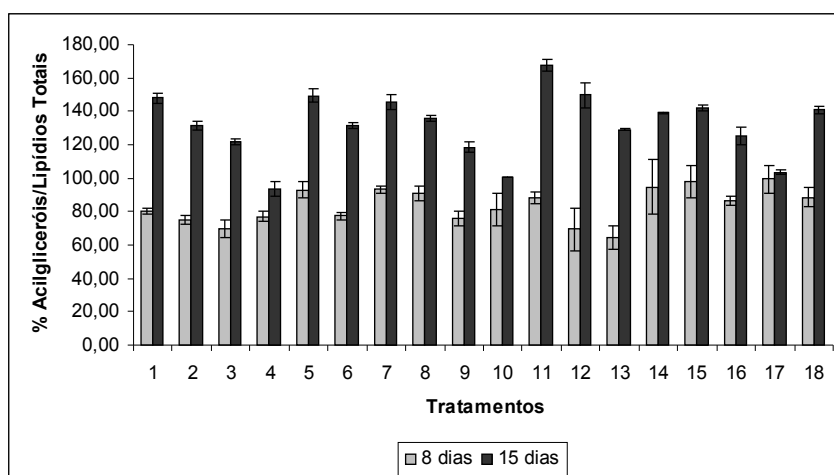


Gráfico 7 – Porcentagem de acilgliceróis obtida na quantidade de lipídios totais extraídos.

Em termos da quantidade de acilgliceróis por litro de meio de cultivo, os tratamentos que receberam uma menor quantidade de fósforo (1, 2, 5, 6 e 11) tiveram uma menor produção (gráfico 8). As amostras 3, 4, 7 e 8, que receberam maior quantidade de fósforo, produziram quantidades superiores a 5 mg/L em 8 dias e aumentaram a quantidade em miligramas de acilgliceróis por litro de meio, com o passar dos dias, em 27 a 100%. O tratamento 13 (nitrogênio 0, fósforo 0 e glicerol -1,68), comparado aos outros tratamentos,

teve uma baixa produtividade em mg/L. Isso pode estar relacionado ao fato de ter recebido uma quantidade muito baixa de glicerol.

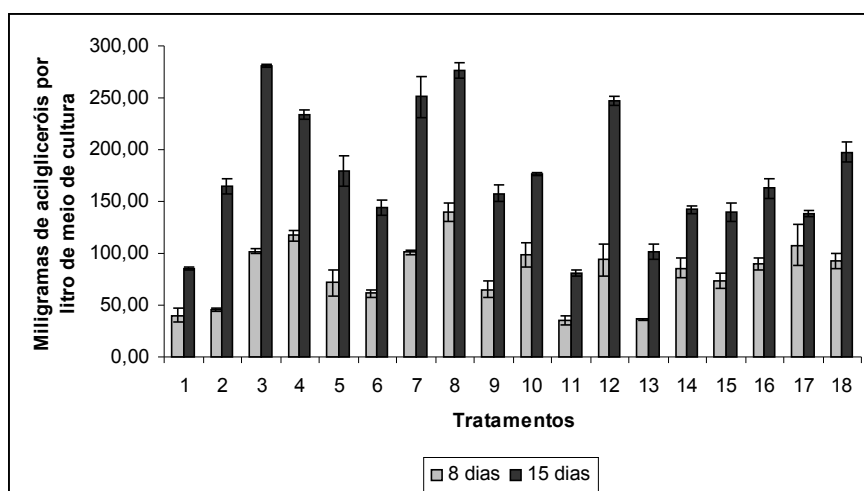


Gráfico 8 – Miligramas de acilgliceróis por litro de meio de cultura.

Este resultado aparentemente está relacionado tanto com os valores da biomassa seca como com a composição de lipídios em cada tratamento. Os tratamentos que tiveram a maior biomassa tiveram também a maior produção de acilgliceróis e as diferenças nas quantidades de acilgliceróis entre um tratamento e outro está ligada aos diferentes perfis lipídicos em virtude dos diferentes tratamentos recebidos.

O fósforo e o glicerol foram as variáveis que apresentaram maior efeito na quantidade de acilgliceróis formados, como mostra a tabela 15, sendo que o fósforo se mostrou estatisticamente significativo tanto para 8 como para 15 dias de cultivo e o glicerol, apenas para 8 dias de cultivo. Enquanto o nitrogênio está mais relacionado à quantidade de lipídios formados, o fósforo está mais diretamente ligado ao perfil lipídico da microalga em cada tratamento.

Tabela 6 – Efeito e *p-valor* das variáveis respostas em mg de acilgliceróis por litro de meio de cultura e para % de acilgliceróis pela quantidade total de lipídios extraídos para as amostras coletadas em 8 e 15 dias

mg de Acilgliceróis por L de meio de cultura				
Variáveis	8 dias		15 dias	
	Efeito	<i>p-valor</i>	Efeito	<i>p-valor</i>
Fósforo (L)	49,6242	0,0007	109,7589	0,0017
Glicerol (L)	22,1178	0,0462		
% de Acilgliceróis /Lipídios Totais				
Glicerol (L)	15,2152	0,0032		
Fósforo (Q)			20,8752	0,0165

Resultados condizentes com este estudo foram obtidos por Alonso e colaboradores (2000) que cultivaram a *Phaeodactylum tricornutum* em fotobiorreatores em diferentes concentrações de nitrogênio e coletaram amostras em diferentes fases do cultivo. Depois de análises por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa, obtiveram como resultado um percentual de 73% de acilgliceróis quando o meio estava repleto de nitrogênio (10 mM de NaNO_3) e apenas 31% em situações de privação desse nutriente (2 mM). No presente estudo, o tratamento 1, teve uma menor produção de acilgliceróis por ter recebido uma concentração de nitrogênio no nível -1, equivalente a 1 mM, o que condiz com o resultado dos pesquisadores citados.

Pode-se citar também o tratamento 11, onde a concentração de nitrogênio no meio de cultura foi equivalente a 2 mM. Observa-se que esse tratamento obteve o maior percentual de acilgliceróis, mas uma pequena quantidade em miligramas por litro de meio de cultura, o que pode ser explicado pelo baixo valor de biomassa seca desse tratamento. A privação de nitrogênio pode ter, primeiro, restringido a produção de biomassa e, segundo, direcionado o metabolismo da microalga à produção de lipídios de reserva para enfrentar o período de privação (ALONSO et al, 2000).

Os estudos de otimização do meio de cultivo feitos no presente trabalho representam somente a parte inicial de um processo de otimização do processo. Para seguimento destes estudos, além da manipulação bioquímica do meio, outras condições de cultivo também devem ser otimizadas, como por exemplo: a intensidade luminosa, o local de cultivo (em tanques ou fotobiorreatores) e o sistema de cultivo (em batelada, de forma contínua ou semi-contínua).

Apesar de não ter sido possível obter os valores otimizados para as variáveis resposta consideradas, este trabalho mostrou-se como um bom indicativo para estudos posteriores que envolvam a manipulação das condições de crescimento para a produção de lipídios. Tanto a biomassa seca como a concentração de lipídios alcançaram valores maiores no DCCR do que os obtidos para o Plackett Burman, indicando que o primeiro delineamento foi eficiente em apontar a direção correta a ser seguida no segundo delineamento, o que implicou em melhores resultados para essas variáveis resposta no DCCR, embora não tenha sido alcançado um ponto ótimo (apêndice 4).

Apesar da microalga ter a capacidade de assimilar carbono orgânico, o glicerol não pareceu ser a melhor fonte desse nutriente por não ter tido efeitos estatisticamente significativos para a maioria das variáveis resposta na faixa de concentração utilizada. Novas

faixas de concentração para essa variável poderão ser testadas em estudos posteriores. Apesar de o glicerol ser uma fonte de carbono interessante por ser um resíduo da fabricação de biodiesel, outras fontes alternativas de carbono orgânico também poderiam ser testadas, como por exemplo, a glicose ou o amido, mas essas outras fontes agregariam custos ao processo produtivo, indo contra a idéia de uma cadeia produtiva sustentável.

Neste trabalho, foi mostrado que uma maior quantidade de lipídios está relacionada com uma maior quantidade de biomassa sendo importante considerar essa informação ao formular um meio de cultura. Aliado a altos valores em biomassa, a produtividade em lipídios também é importante e condições que potencializem essa produtividade devem ser consideradas, como a privação de nitrogênio e fósforo.

Entretanto, isso não quer dizer que cultivar a microalga num meio pobre em nitrogênio seja uma boa estratégia. Este trabalho mostrou que meios inicialmente pobres em nitrogênio e fósforo resultam em valores pequenos de biomassa. Uma melhor estratégia seria fornecer nitrogênio e fósforo suficiente no início do cultivo para permitir a produção de uma quantidade grande de células, mas formular o meio de tal maneira que esses nutrientes se esgotem em poucos dias (no caso da *Phaeodactylum tricornutum*, entre 5 a 8 dias), estimulando a produção de lipídeos. Em outras palavras, induzir uma condição de privação através do esgotamento dos nutrientes do meio gerado pelo grande número de células é melhor estratégia do que fornecer pouco nutriente à alga e ter um baixo número de células.

Uma maneira de colocar em prática essa estratégia é fazer dois ciclos de crescimento. Num primeiro ciclo, a alga é cultivada durante sua fase exponencial em meio rico em nutrientes. Num segundo ciclo a alga é transportada para um meio pobre para acumular lipídios (COURCHESNE et al., 2009). Durante o processo de produção do biodiesel, essa alternativa será viável se houverem técnicas baratas de recuperação e transferência da biomassa e desde que esses custos sejam compensados pela maior produtividade em lipídios.

O fósforo foi a variável que se mostrou mais estatisticamente significativa, nas concentrações estudadas (ver apêndice 7), sendo que uma sugestão para estudos posteriores é aumentar ainda mais as concentrações deste nutriente para verificar o comportamento da microalga na produção de lipídios.

Estudos mais aprofundados a respeito do perfil lipídico da *Phaeodactylum tricornutum* nas condições estudadas seriam interessantes por elucidar as concentrações reais de acilgliceróis e grau de insaturação, bem como a quantidade de outros lipídios produzidos pela microalga, como os galactolipídios e fosfolipídios. Técnicas como a cromatografia de

massa acoplada à espectrometria de massa podem dar informações completas sobre o perfil lipídico da microalga.

A microalga *Phaeodactylum tricornutum* mostrou ter potencial para a produção de lipídios. Entretanto, para a produção de biodiesel, essa quantidade de lipídios produzidos ainda é baixa, o que tornaria o processo economicamente inviável. Outras microalgas mostraram ser maiores produtoras de lipídios do que a *Phaeodactylum tricornutum*, como a *Chlorella protothecoides* que atingiu um percentual lipídico de 58% por grama de biomassa seca e 26 g/L de lipídios quando cultivadas em biorreator por 7 dias com cultivo heterotrófico utilizando glicose como fonte de carbono (XIONG et al, 2008). A *Phaeodactylum tricornutum* poderia ser utilizada em processos de produção de lipídios de alto valor agregado como os ácidos graxos polinsaturados EPA (ácido eicosapentanóico) e DHA (ácido docohexanoico), sendo economicamente viável nesse caso, mesmo considerando os rendimentos relativamente baixos que foram obtidos neste trabalho (YONGMANITCHAI; WARD, 1990).

Os estudos realizados mostraram ser um bom indicativo para estudos posteriores de otimização. O planejamento fatorial mostrou-se uma ótima ferramenta, reduzindo o número de experimentos a serem realizados, economizando tempo, reduzindo custos de pesquisa e gerando dados estatísticos confiáveis.

A manipulação dos nutrientes foi eficiente em aumentar a produção de lipídios, sendo uma estratégia que deve ser mais explorada em estudos futuros. Vários pesquisadores no mundo estão utilizando a manipulação bioquímica do meio de cultura para aumentar o rendimento da produção de lipídios e obtendo bons resultados. Cogita-se a utilização de engenharia genética para aumentar a produção de lipídios por microalgas, mas, pelos altos custos em pesquisa e desenvolvimento, essa ainda é uma técnica viável apenas para produtos de alto valor agregado, como algumas proteínas destinadas à indústria farmacêutica. Ainda, estudos voltados à utilização de fatores de transcrição para controlar a atividade de enzimas relacionadas com a produção de um produto de interesse tem crescido em todo o mundo, mas não são viáveis, pois ainda não se conhece toda a fisiologia das microalgas e seus mecanismos regulatórios envolvidos na produção de lipídios (COURCHESNE et al 2009).

Para o biodiesel de microalgas se tornar economicamente viável, devem ser realizados mais pesquisas voltadas ao aumento da eficiência do processo de produção do biodiesel. Isso inclui estudos voltados ao aumento da produção de lipídios pela microalga, desenvolvimento de melhores técnicas de extração que minimizem perdas e aumentem o rendimento dos

lipídios extraídos e técnicas que permitam a conversão de todos esses lipídios em biodiesel. Além disso, os custos de produção devem permitir que o preço final do biodiesel de microalgas seja competitivo frente ao diesel de petróleo. Só assim, o biodiesel de microalgas se tornará tão viável quanto é promissor.

6 CONCLUSÃO

Este trabalho mostrou que a manipulação do meio de cultura é uma estratégia muito eficiente em aumentar a quantidade de lipídios produzidos pela microalga *Phaeodactylum tricornutum* sendo que experimentos futuros aumentando ainda mais as concentrações de nitrogênio, fósforo e glicerol podem ser realizados com a certeza de bons resultados.

Entretanto, a microalga *Phaeodactylum tricornutum* tem pouco potencial para a produção de lipídios visando o biodiesel já que, apesar das manipulações do meio de cultura, a produção lipídica não foi suficiente para esse fim. Outra microalga deveria ser selecionada e testada para fins de produção de biodiesel.

7 REFERENCIAS:

ALONSO, D. L. et al. Acyl lipid composition variation related to culture age and nitrogen concentration in continuous culture of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. **Photochemistry**, nº54, p 461 – 471, 2000.

BEARDALL, J.; YOUNG. E.; ROBERTS, S.; Approaches for determining phytoplankton nutrient limitation. **Aquatic Sciences**, nº63, p. 44 – 69, 2001.

BRITO, E. S. de ; PINTO, Gustavo Adolfo Saavedra ; BRUNO, Laura Maria ; AZEREDO, Henriette Monteiro Cordeiro de . **A metodologia de superfície de resposta (MSR) na otimização de processos biológicos: A determinação dos valores de pH e temperatura ótimos para a atividade enzimática**. In: VI REUNIÃO REGIONAL DA SBBq NORDESTE, 2002, Fortaleza, 2002.

CERON GARCÍA, M. C. Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricornutum* on glycerol: growth rate and fatty acid profile. **Journal of Applied Phycology**, nº 12, p. 239 – 248, 2000.

CHISTI, Yusuf. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**. Nº 25, p. 294 – 306, 2007.

COSTA, J. A. V. et al. Perfil de ácidos graxos das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutissima* cultivadas em diferentes condições. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v.17, n.4, 2006.

COUCHERSNE, N. M. D. et al. Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches. **Journal of Biotechnology**, v. 141, p. 31-41, 2009.

DERNER, Roberto Bianchini. **Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos polinsaturados**. 2006. 158 fls. Tese (Pós-graduação em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina.

FÁBREGAS, J. et al. Mixotrophic productivity of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* cultured with soluble fractions or rye, wheat and potato. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, nº 13, p. 349 – 351.

GONG, X.; CHEN, F. Optimization of culture medium for growth of *Haematococcus pluvialis*. **Journal of Applied Phycology**, nº 9, p. 437 – 444, 1997.

GONZÁLES, M. A. S. **Teste F de snedecor**. Disponível em <<http://www.exatec.unisinos.br/~gonzalez/valor/inferenc/testes/testef.html>>. Acesso em 14 jan. 2010.

GRANT, Coral. **Characteristics of nitrogen- and iron-limited growth in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*, and in natural Phytoplankton population**, 2001. Thesis (Doctor in Philosophy). University of Auckland.

GREENE, R. M.; GEIDER, R. J.; FALKOWSKI, P. G. Effect of iron limitation on photosynthesis in a marine diatom. **Limnol. Oceanogr.**, nº36, vol. 8, 1991, pág. 1772 – 1782.

GRIMA, M. et al. A mathematical model of microalgal growth in light-limited chemostat culture. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, n° 61, p. 167-173, 1994.

HARWOOD, John L.; GUSCHINA, Irina A. The Versatility of algae and their lipid metabolism. **Biochimie**, p. 1 – 6, 2009.

HUANG, G. et al. Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied Energy**, v. 06, 2009

KAIXIAN, Qian; BOROWITZKA, Michael A. Light and Nitrogen Deficiency Effects on the Growth and Composition of *Phaeodactylum tricornutum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 38, p. 93 – 103, 1993.

KAPS, M.; LAMBERSON, W. R. **Biostatistic for Animal Science**. CABI-Publishing: Cambridge, 2004.

KHOZIN-GOLDBERG, Inna; COHEN, Zvi. The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. **Phytochemistry**, n°67, 2006, p. 696 – 701.

KLEIN, V. L. M.; GONZALES, A. A. Cultivo da microalga *Tetraselmis chuii* Prings em diferentes meios de cultura. **Ciênc. Agron.**, Fortaleza, v. 24, n° 1/2, 91 – 100, jun/dez, 1993.

KUDO, I. et al. Combined effects of temperature and iron on the growth and physiology of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* (*Bacillariophyceae*). **Journal of Phycology**, n°36, p. 1096 – 1102, 2000.

LEHNINGER, Principles of Biochemistry 4th Editoin - D L Nelson, Cox Lehninger - W H Freeman 2004

LIU, Z.; WANG, G.; ZHOU, B. Efect or iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, n° 99, p. 4717 – 4722, 2008.

LOMBARDI, A. T.; WANGERSKY, P. J. Influence of phosphorus and silicon on lipid class production by the marine diatom *Chaetoceros gracilis* grown in turbidostat cage cultures. **Marine Ecology Progress Series**, v. 77, p. 39 – 47, out. 1991.

LOURENÇO, Sergio O. **Cultivo de Microalgas Marinhas** - princípios e aplicações. São Carlos: RiMa, 2006.

MATEUS, N. B.; BARBIN, D.; CONAGIN, A. Viabilidade de uso do Delineamento Composto Central. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 6, p. 1537 – 1546, 2001.

MEINERS, L. I. **Influência da temperatura, salinidade e nutrientes dissolvidos (N e P) no cultivo de microalgas de água estuarina e costeira**. 2007, 76 fls. Dissertação (Programa de Pós Graduação em Aquicultura). Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2007.

MENG, Xin et al. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable Energy**, n°34, p. 1 – 5, 2008.

MONTGOMERY, D. G. **Design and Analysis of Experiments**. New York: John Wiley & Sons, 2001.

O BIODIESEL. Disponível em: <http://www.biodiesel.gov.br>. Acesso em 13 fev. 2009.

PEREZ, H. E. B. **Biodiesel de Microalgas**. Parte 1. Disponível em: <http://www.energiaverde.com.br>. Acesso em 16 set 2008.

RAOOF, B.; KAUSHIK, B.D.; PRASANA, R. Formulation of a low-cost medium for mass production of *Spirulina*. **Biomass and Bioenergy**, v. 30, n. 6, p. 537 – 542, 2006.

REBOLLOSO-FUENTES et al. Biomass Nutrient Profiles of the Microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Food Biochemistry*. V. 25, p. 57-76, 2001.

RODRIGUES, M. I. IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos**. Campinas, SP: Casa do Pão Editora, 2005.

ROESSLER, Paul. Effects of silicon deficiency on lipid composition and metabolism in the diatom *Cyclotella cryptica*. **Journal of Phycology**. v. 24, p. 394 – 400, 2008.

SANTOS, G. M. dos; MACEDO, R. V. T. de; ALEGRE, R. M. Influência do teor de nitrogênio no cultivo de *Spirulina máxima* em duas temperaturas – Parte I: Alteração da Composição da Biomassa. **Ciência e Tecnologia em Alimentos**, Campinas, v. 23(Supl), 17 – 21, dez. 2003.

SRIHARAN, S.; BAGGA D.; SRIHARAN, T. P. Effects of Nutrients and Temperature on Lipid and Fatty Acid Production in the Diatom *Hantzshia* DI-60. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 24/25, p. 309 – 316, 1990

SIRÓN, Robert. GIUSTI, Gérard, BERLAND, Brigitte. Changes in the fatty acid composition of *Phaeodactylum tricornutum* and *Dunaliella tertiolecta* during growth and under phosphorus deficiency. **Marine Ecology Progress Series**, vol. 55, p 95 – 100, 1989.

SONG, D.; FU, J.; SHI, D. Exploitation of Oil-bearing Microalgae for Biodiesel. **Chinese Journal of Biotechnology**, n° 3, v. 24, march, 2008.

SPOLAORE, P. et al. Commercial Applications of Microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. Japan, Vol 101, n° 2, p. 87-96, 2006.

TAKAGI, M.; YOSHIDA, T. Effect of Salt Concentration on Intracellular Accumulation of Lipids and Triacylglyceride in Marine Microalgae *Dunaliella* Cells. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, vol. 101, n°3, 2005, p.223 – 226.

TEIXEIRA, Claudia Maria. **Microalga como matéria-prima para a produção de biodiesel**. Disponível em: <http://www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2006/agricultura/MicroalgaComo.pdf>. Acesso em: 13 dez. 2008.

TOLEDO, Maria Luiza. **DOE** – Experimentos de Superfície de Resposta (Response Surface Designs). Disponível em: <http://www.minitabbrasil.com.br/novidades/artigos/DOE-Response%20Surface%20Designs.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2009.

XIONG, W. et al. High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production. **Applied Micrological Biotechnology**, vol 78, p.29 – 36, 2008.

YANG, Chen; HUA, Qiang; SHIMIZU, Kazuyuki. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, p. 87–102, 2000.

YONGMANITCHAI, W.; WARD, P. Growth og and Omega-3 Fatty Acid Production by *Phaeodactylum tricornutum* under Different Culture Conditions. **Applied and Environmental microbiology**. February, p. 419 - 425. 1991,

ANEXO 1

PROTOCOLO DE UTILIZAÇÃO DO CLOROTEST (Labcon®)

- 1 – Coletar aproximadamente 10 mL da água a ser testada.
- 2 - Adicione 3 gotas do reagente.
- 3 - Homogeneizar.
- 4 - Uma coloração amarelada indica presença de cloro.

COMPOSIÇÃO:

- O-toluidina
- Ácido clorídrico
- Água destilada

Referência:

LABCON Clorotest. Disponível em:

<<http://www.labcon.com.br/peixesaquario/testes/clorotest.htm>>. Acesso em 08 jul. 2009.

APÊNDICE 1: Soluções estoque para preparo do meio de cultura F/2 Guillard

Para preparo do meio F/2 Guillard, prepara-se 5 soluções principais:

- solução de nitrogênio;
- solução de fósforo;
- solução de ferro;
- solução de vitaminas;
- solução de metais.

PARA CADA LITRO DE MEIO DE CULTURA:

- 1,0 mL de solução de NaNO_3
- 1,0 mL de solução de NaHPO_4
- 0,5 ml de solução de Solução de Metais
- 2,0 ml de solução de Vitaminas;
- 0,5 ml de Solução de Silicato;
- 5,0 ml de Solução de TRIS.

- Solução de NaNO_3 75 g/L

NaNO_3	75 g
Água destilada	1 L

- Solução de NaHPO_4 5 g/L

NaNO_3	5 g
Água destilada	1 L

- Solução de NaNO_3 337,5 g/L

NaNO_3	337,5 g
Água destilada	1 L

- Solução de NaHPO_4 10 g/L

NaNO_3	10 g
Água destilada	1 L

- Solução de Vitaminas

Tiamina (Vitamina B1)	100 mg
Biotina (Vitamina B2)	1 mg
Cianocobalamina (Vitamina B12)	1 mg
Água Destilada	1000 mL

Proteger da Luz , encapando o frasco com papel alumínio. Esterilizar por ultrafiltração.

- Solução de Metais com concentração de Ferro 4 g/L

EDTA.....	5,5 g
Cloreto Férrico	4 g
Cloreto de Manganês.....	0,18 g
Solução de metais traço	10 mL
Água destilada	1000 mL

- Solução de Metais com concentração de Ferro 2 g/L

EDTA.....	5,5 g
Cloreto Férrico	2 g
Cloreto de Manganês.....	0,18 g
Solução de metais traço	10 mL
Água destilada	1000 mL

- Solução de Metais com concentração de Ferro 3 g/L

EDTA.....	5,5 g
Cloreto Férrico	3 g
Cloreto de Manganês.....	0,18 g
Solução de metais traço	10 mL
Água destilada	1000 mL

- Solução de Metais Traço

Sulfato de Cobre	1 g
Sulfato de Zinco	2,2 g
Cloreto de Cobalto	1 g
Molibdato de Sódio	0,63 g
Água Destilada	1000 mL

APÊNDICE 2

Preparo dos meios de cultura para o planejamento Plackett Burmann

Erlenmeyer	Sol. Trab. Vitaminas (ml)	Sol. Nitrato 150 g/L (ml)	Sol. Fosfato 5 g/L (ml)	Sol. Trab. Metais (Fe 4 mg)	Sol. Trab. Metais (Fe 3 mg)	Sol. Trab. Metais (Fe 2 mg)	Sol. TRIS (ml)	Sol. Sílica (ml)	Glicerol (ml)
1	1,7	3,4	0,9			3,4	8,5	1,7	2,5
2	1,7	3,4	1,7			3,4	8,5	0,9	5,0
3	1,7	3,4	1,7	3,4		-	8,5	0,9	2,5
4	1,7	1,1	1,7	3,4		-	8,5	1,7	2,5
5	1,7	3,4	0,9	3,4		-	8,5	1,7	5,0
6	1,7	1,1	1,7			3,4	8,5	1,7	5,0
7	1,7	1,1	0,9	3,4		-	8,5	0,9	5,0
8	1,7	1,1	0,9			3,4	8,5	0,9	5,0
9	1,7	3,4	1,7	3,4		-	8,5	1,7	5,0
10	1,7	2,3	1,3		3,4	-	8,5	1,3	3,7
11	1,7	2,3	1,3		3,4		8,5	1,3	3,7
12	1,7	2,3	1,3		3,4	-	8,5	1,3	3,7
Soma	20,4	28,3	15,7	17,0	10,2	13,6	102,0	15,7	48,6

Preparo dos meios de cultura para o DCCR:

Erlenmeyer	Sol. Nitrato 337,5 g/L (ml)	Sol. Fosfato 10 g/L (ml)	GLICEROL (mL)	Sol. Trab. Metais (Fe 4 mg)	Sol. TRIS (ml)	Sol. Sílica (ml)	Sol. Trab. Vitaminas (ml)
1	0,49	0,49	4	0,850	8,500	1,700	1,700
2	1,39	0,49	4	0,850	8,500	1,700	1,700
3	0,49	1,39	4	0,850	8,500	1,700	1,700
4	1,39	1,39	4	0,850	8,500	1,700	1,700
5	0,49	0,49	16	0,850	8,500	1,700	1,700
6	1,39	0,49	16	0,850	8,500	1,700	1,700
7	0,49	1,39	16	0,850	8,500	1,700	1,700
8	1,39	1,39	16	0,850	8,500	1,700	1,700
9	0,19	0,95	10	0,850	8,500	1,700	1,700
10	1,7	0,95	10	0,850	8,500	1,700	1,700
11	0,95	0,19	10	0,850	8,500	1,700	1,700
12	0,95	1,7	10	0,850	8,500	1,700	1,700
13	0,95	0,95	0	0,850	8,500	1,700	1,700
14	0,95	0,95	20	0,850	8,500	1,700	1,700
15	0,95	0,95	10	0,850	8,500	1,700	1,700
16	0,95	0,95	10	0,850	8,500	1,700	1,700
17	0,95	0,95	10	0,850	8,500	1,700	1,700
18	0,95	0,95	10	0,850	8,500	1,700	1,700
TOTAL	17,0	17,0	180,0	15,3	153,0	30,6	30,6

APÊNDICE 3: Curvas de Crescimento para o planejamento DCCR

Cada gráfico representa um tratamento do planejamento. Os ajustes das curvas foram feitos pelo método logístico.

As barras em cada ponto representam o erro de no máximo 10% para as contagens na câmara de Neubauer e o número de células ajustado. Os pontos com erros maiores do que 10% foram desprezados.

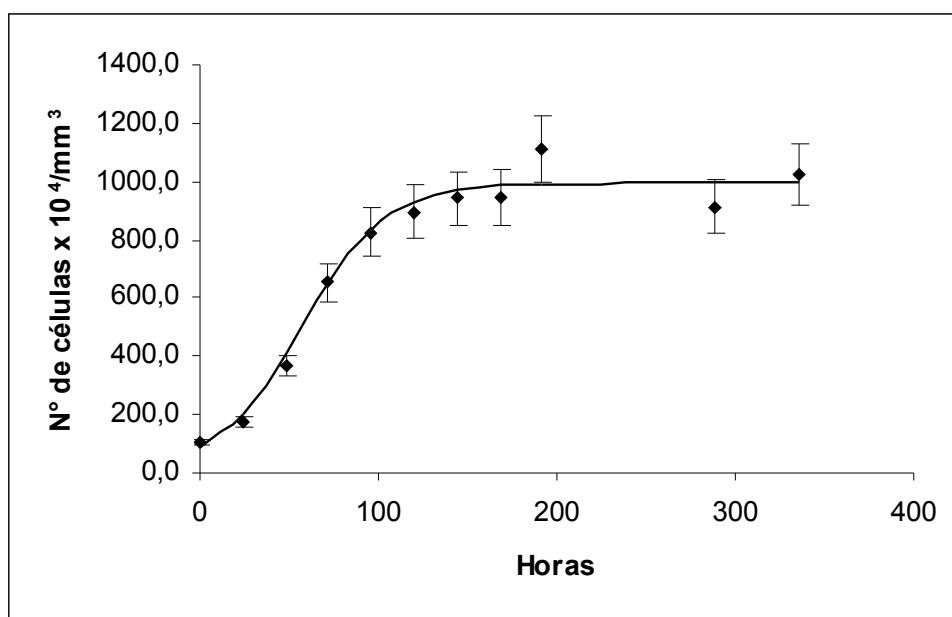


Gráfico 1 – Curva de crescimento para o tratamento 1. Nitrogênio (-1), Fósforo (-1) e Glicerol (-1).

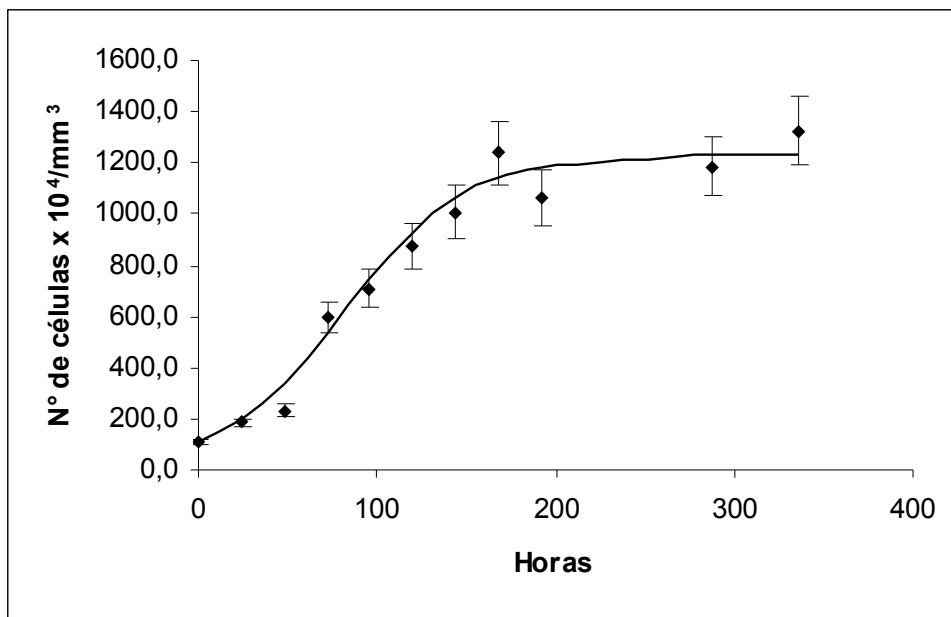


Gráfico 2 – Curva de crescimento para o tratamento 2. Nitrogênio (1), Fósforo (-1) e Glicerol (-1).

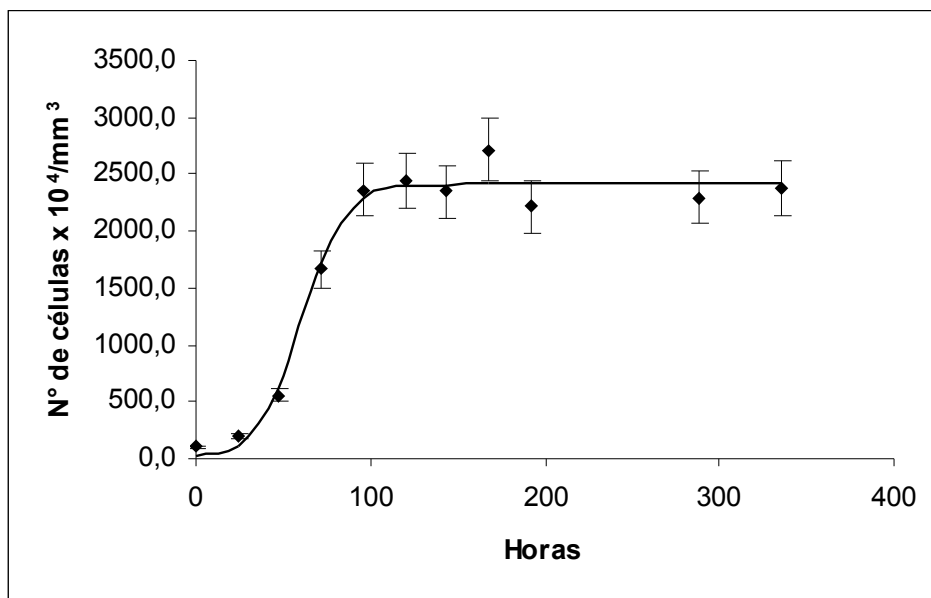


Gráfico 3 – Curva de crescimento para o tratamento 3. Nitrogênio (-1), Fósforo (1) e Glicerol (-1).

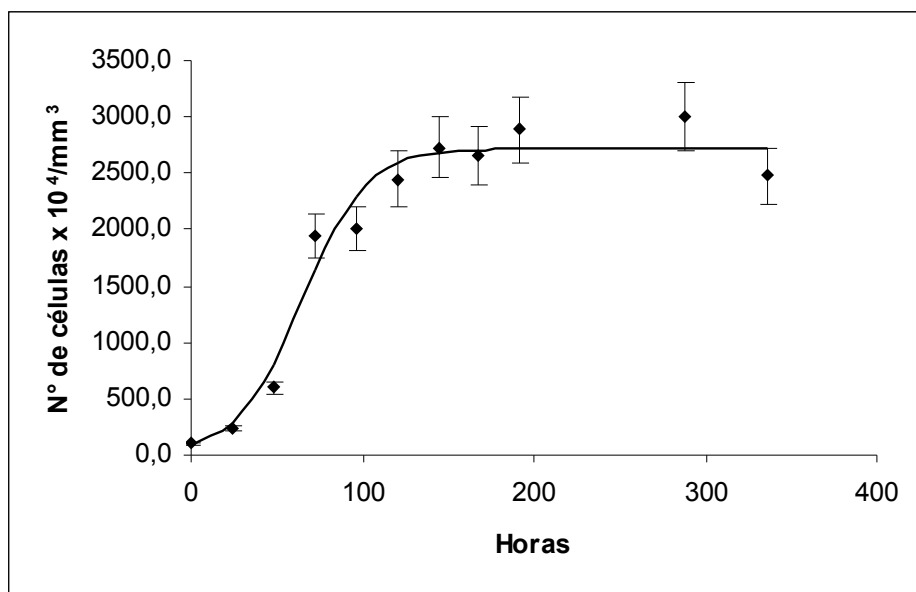


Gráfico 4 – Curva de crescimento para o tratamento 4. Nitrogênio (1), Fósforo (1) e Glicerol (-1).

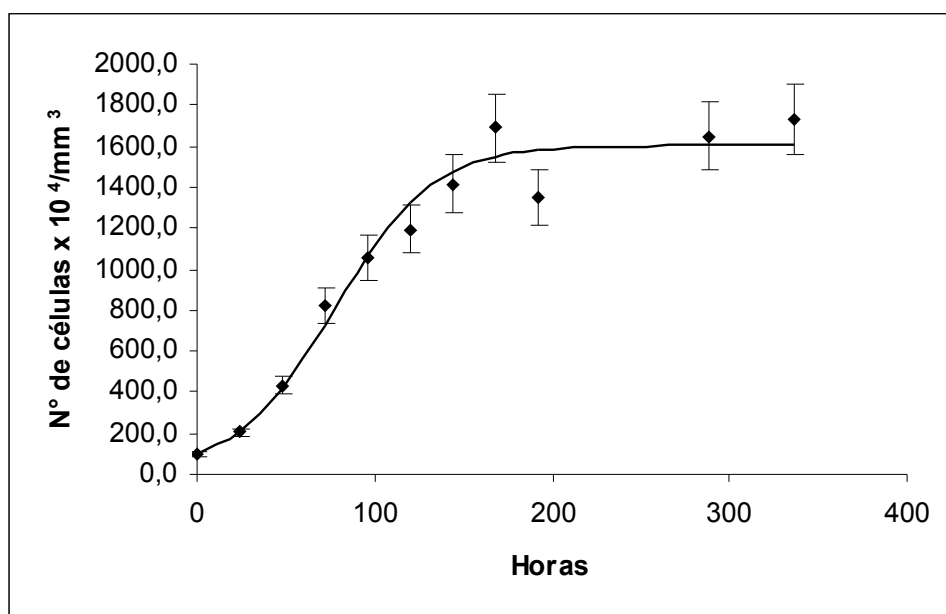


Gráfico 5 – Curva de crescimento para o tratamento 5. Nitrogênio (-1), Fósforo (-1) e Glicerol (1).

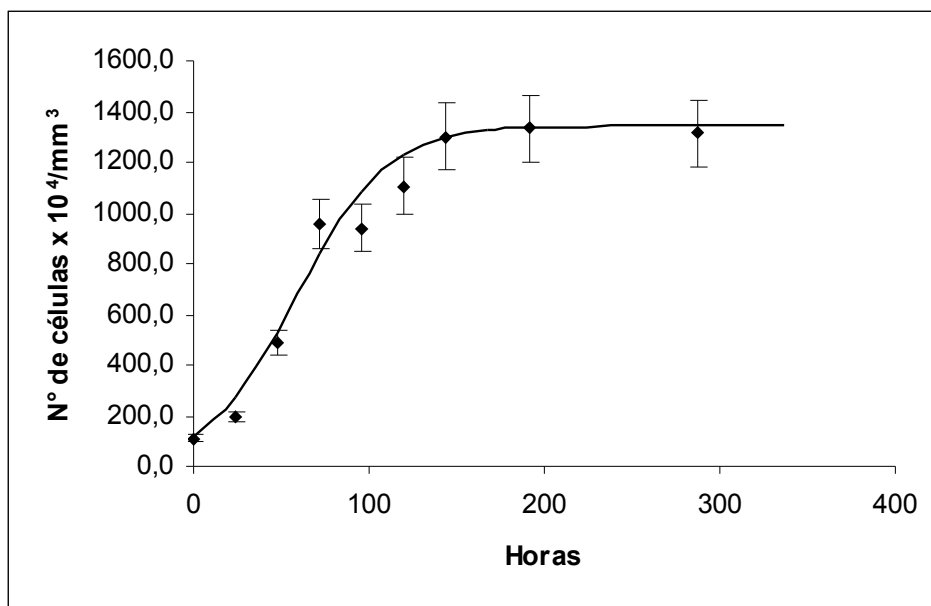


Gráfico 6 – Curva de crescimento para o tratamento 6. Nitrogênio (1), Fósforo (-1) e Glicerol (1).

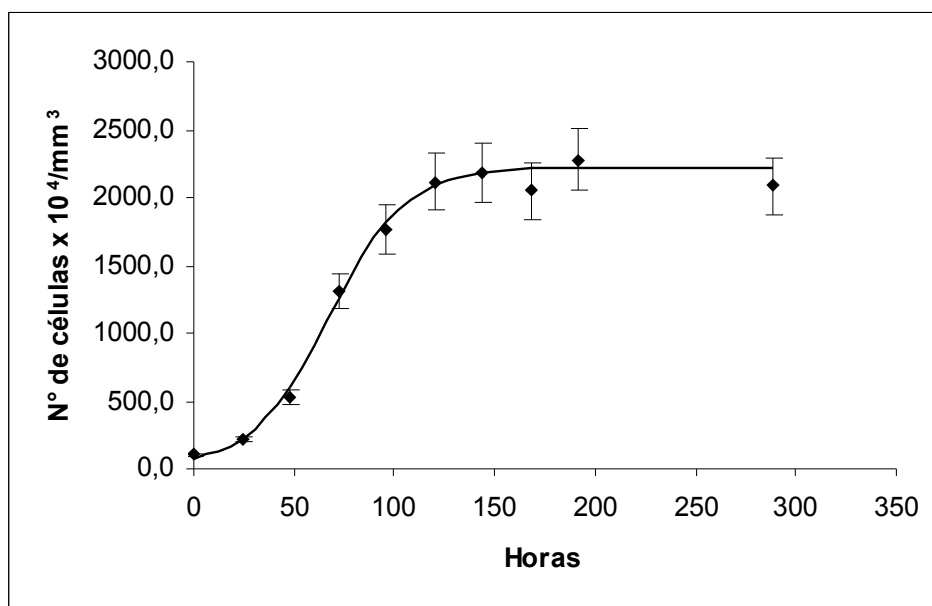


Gráfico 7 – Curva de crescimento para o tratamento 7. Nitrogênio (-1), Fósforo (1) e Glicerol (1).

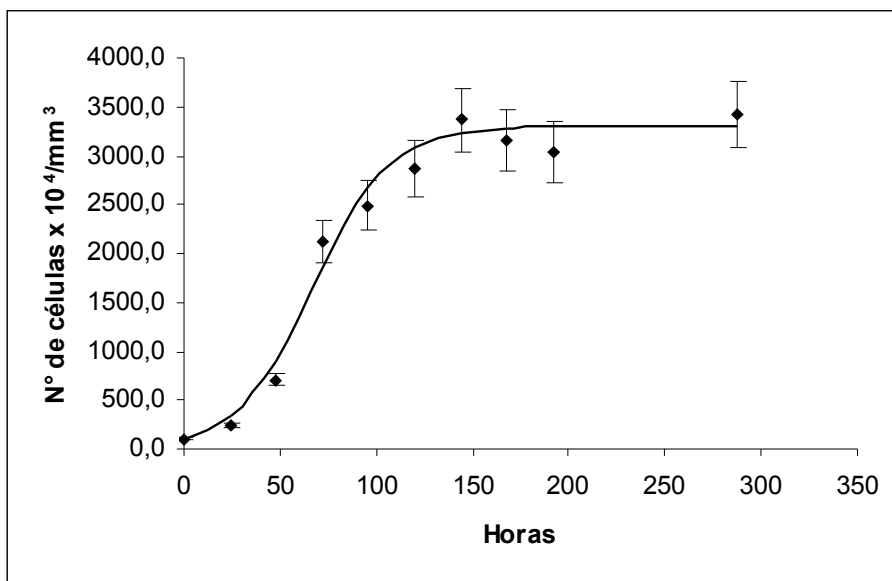


Gráfico 8 – Curva de crescimento para o tratamento 8. Nitrogênio (1), Fósforo (1) e Glicerol (1).

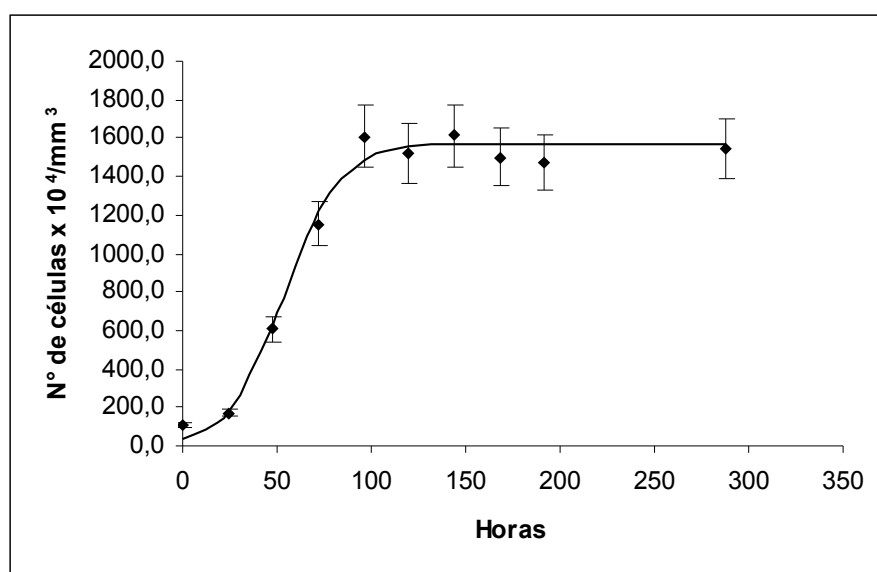


Gráfico 9 – Curva de crescimento para o tratamento 9. Nitrogênio (-1,68), Fósforo (0) e Glicerol (0).

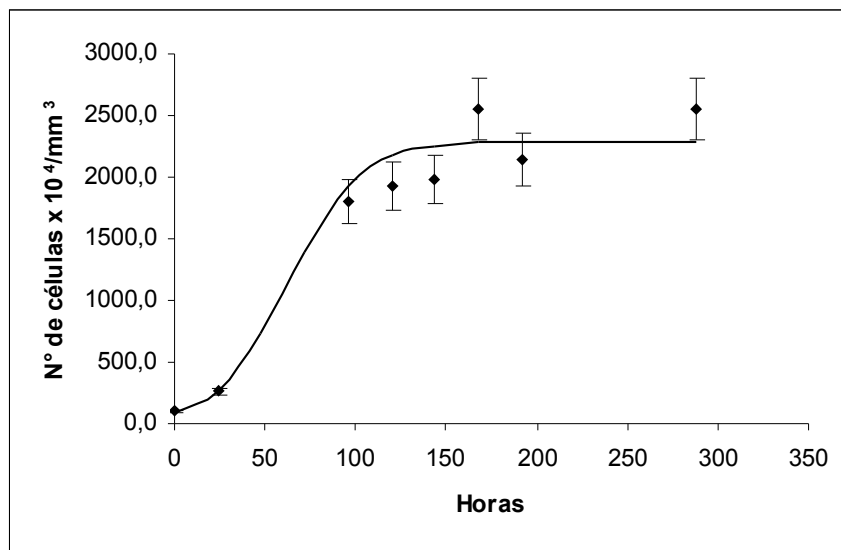


Gráfico 10 – Curva de crescimento para o tratamento 10. Nitrogênio (1,68), Fósforo (0) e Glicerol (0).

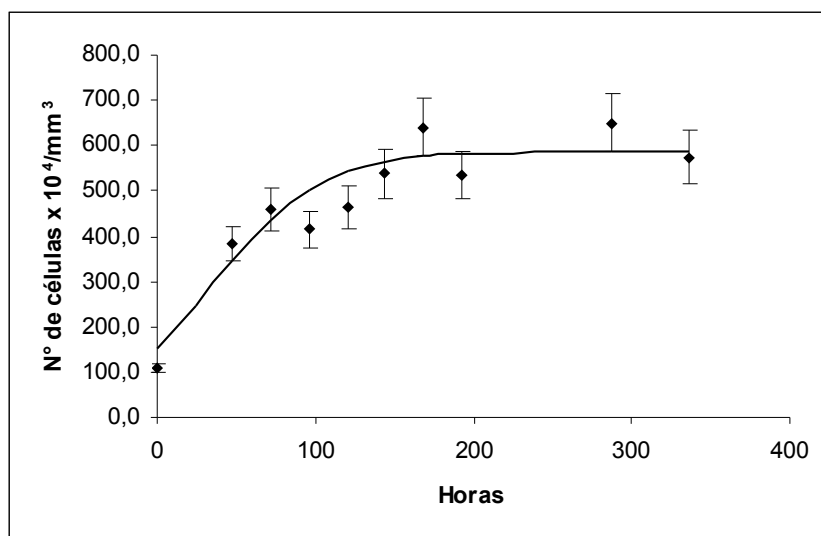


Gráfico 11 – Curva de crescimento para o tratamento 11. Nitrogênio (0), Fósforo (-1,68) e Glicerol (0).

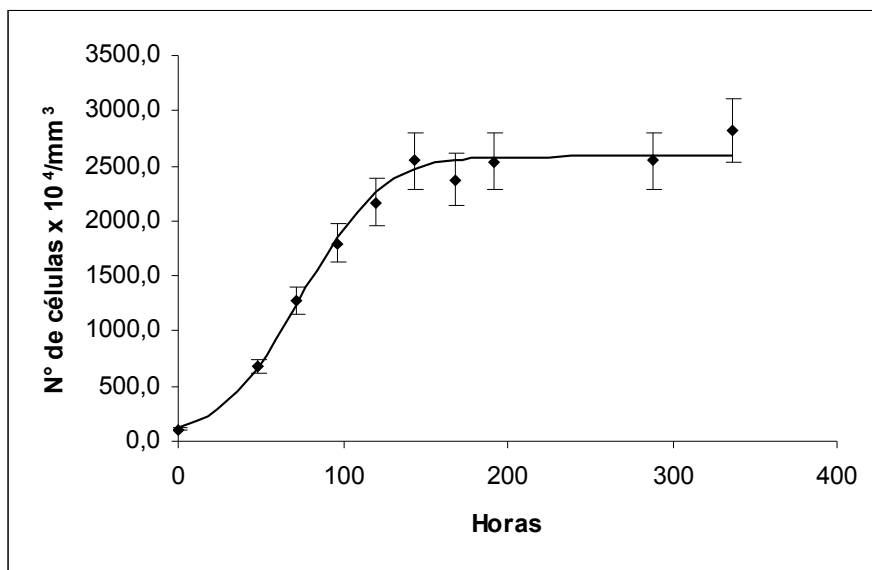


Gráfico 12 – Curva de crescimento para o tratamento 12. Nitrogênio (0), Fósforo (1,68) e Glicerol (0).

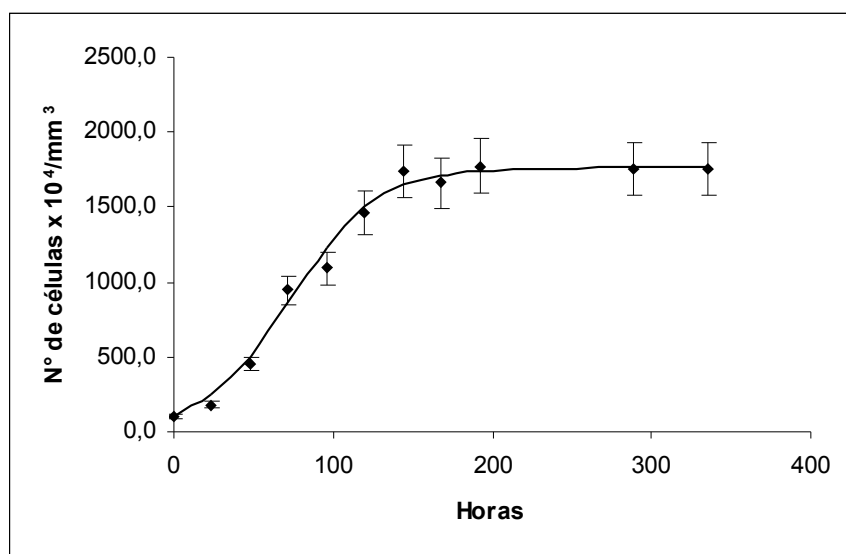


Gráfico 13 – Curva de crescimento para o tratamento 13. Nitrogênio (0), Fósforo (0) e Glicerol (-1,68).

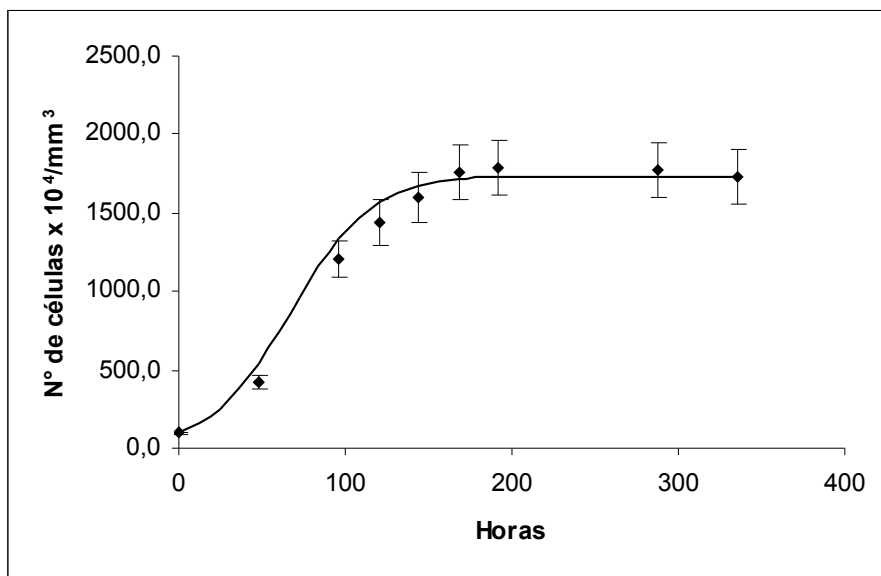


Gráfico 14 – Curva de crescimento para o tratamento 14. Nitrogênio (0), Fósforo (0) e Glicerol (1,68).

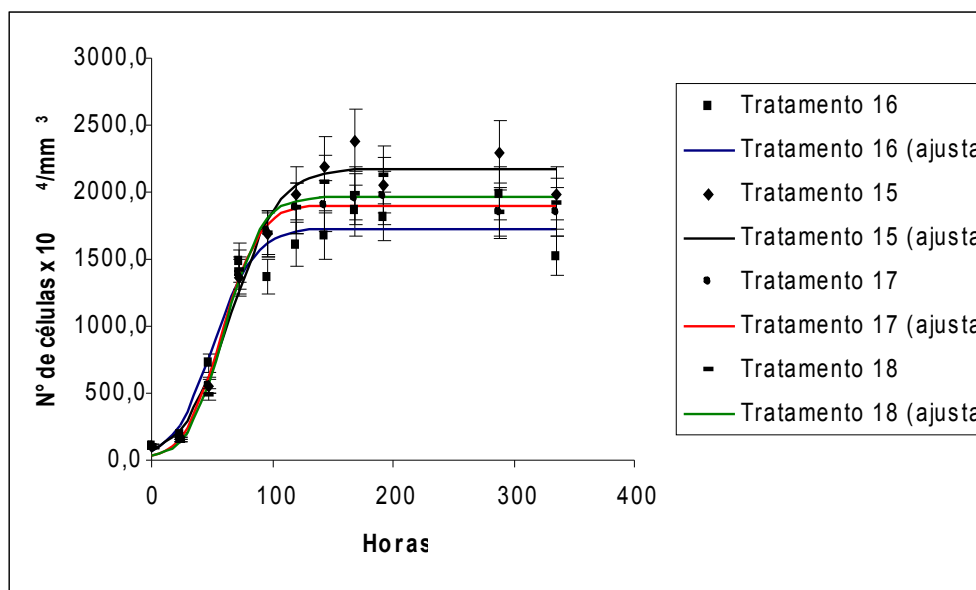


Gráfico 15 – Curva de crescimento para o tratamento 15, 16, 17 e 18, com os pontos centrais do experimento. Nitrogênio (0), Fósforo (0) e Glicerol (0).

APÊNDICE 4: Valores encontrados nas análises para as variáveis resposta no delineamento Plackett Burman e análise estatística dos dados

* epm – erro padrão da média

Tabela 1 – Gramas de Biomassa Seca por Litro de Meio de Cultura

	8 dias		10 dias		12 dias		15 dias	
	média	epm	média	epm	média	epm	média	epm
1	0,47	0,02	0,51	0,03	0,56	0,04	0,52	0,02
2	0,63	0,01	0,69	0,03	0,72	0,01	0,69	0,03
3	0,71	0,01	0,73	0,01	0,73	0,02	0,77	0,04
4	0,67	0,01	0,67	0,02	0,69	0,02	0,71	0,02
5	0,48	0,03	0,50	0,02	0,54	0,02	0,52	0,03
6	0,74	0,01	0,73	0,01	0,72	0,01	0,70	0,01
7	0,39	0,01	0,43	0,02	0,49	0,01	0,52	0,04
8	0,45	0,01	0,48	0,02	0,48	0,02	0,53	0,01
9	1,07	0,05	1,04	0,05	1,09	0,03	1,04	0,03
10	0,77	0,02	0,91	0,07	0,81	0,03	0,82	0,01
11	0,77	0,01	0,84	0,05	0,82	0,03	0,84	0,04
12	0,79	0,02	0,85	0,03	0,80	0,01	0,80	0,01

Tabela 2– Percentual de Lipídios por grama de biomassa seca

	8 dias		10 dias		12 dias		15 dias	
	média	epm	média		média	epm	média	epm
1	11,16	0,19	8,30	1,47	9,18	0,26	14,87	1,30
2	8,04	0,30	8,14	0,40	10,70	1,09	15,74	0,45
3	6,51	0,33	7,29	0,39	13,15	2,25	14,53	0,53
4	5,85	0,04	6,43	0,11	9,66	0,11	18,97	1,30
5	5,96	0,29	6,86	0,55	11,92	0,98	14,93	0,36
6	5,05	0,26	5,16	0,02	11,60	0,56	12,79	1,08
7	7,61	1,14	7,42	0,10	11,00	0,69	13,23	0,14
8	5,19	0,37	6,87	0,04	17,78	0,10	16,17	1,69
9	6,51	0,16	9,59	0,24	16,19	0,56	16,57	0,27
10	5,43	0,17	11,42	0,04	13,96	0,18	12,68	0,32
11	6,73	0,45	9,45	1,18	15,22	0,22	17,72	0,75
12	5,69	0,33	8,75	0,53	11,45	0,15	13,17	0,12

Tabela 3 – Miligramas de Lipídios por Litro de Meio de Cultura

	8 dias		10 dias		12 dias		15 dias	
	média	epm	média	epm	média	epm	média	epm
1	51,88	2,53	41,68	0,00	51,14	0,00	77,48	0,00
2	50,26	1,71	56,26	0,00	76,85	0,00	109,27	0,01
3	46,21	1,52	53,50	0,00	95,29	0,01	111,26	0,00
4	39,36	1,17	42,94	0,00	66,36	0,00	135,05	0,01
5	28,40	2,75	34,49	0,00	64,73	0,00	78,23	0,01
6	37,49	1,42	37,70	0,00	82,99	0,00	89,23	0,00
7	29,83	3,94	32,05	0,00	54,01	0,00	68,70	0,01
8	23,37	1,84	32,81	0,00	85,24	0,00	85,51	0,01
9	67,83	3,79	99,67	0,00	177,43	0,01	172,27	0,00
10	41,64	1,39	103,58	0,01	112,99	0,00	103,42	0,00
11	52,12	3,20	79,82	0,01	125,15	0,01	149,40	0,01
12	48,38	1,27	74,40	0,01	91,19	0,00	105,26	0,00

Tabela 4 – Percentual de Acilgliceróis nos lipídios totais extraídos e miligramas de acilgliceróis por Litro de Meio de Cultura

	8 dias		10 dias		12 dias		15 dias	
	%	mg/L	%	mg/L	%	mg/L	%	mg/L
1	82,47	42,88	74,91	31,69	78,69	54,47	65,61	50,94
2	69,48	35,00	64,73	36,42	49,54	38,18	33,67	36,77
3	76,42	35,33	74,10	39,62	37,64	36,10	34,07	38,07
4	86,78	34,14	68,02	29,17	53,63	35,59	27,30	36,78
5	84,12	23,83	90,22	31,12	43,06	27,91	34,37	26,85
6	78,45	29,42	87,14	32,84	37,16	30,87	33,72	30,07
7	55,45	16,47	73,95	23,71	41,65	22,57	34,64	23,81
8	81,64	19,03	71,32	23,43	25,77	21,98	28,33	24,21
9	78,64	54,62	55,71	55,60	29,53	52,34	28,84	49,72
10	91,37	38,04	57,86	59,95	37,51	42,44	41,32	42,71
11	75,56	39,34	73,70	58,37	31,62	39,54	26,37	39,46
12	88,85	40,16	51,94	38,81	43,99	40,11	35,35	37,21

APÊNDICE 5 : Dedução das fórmulas utilizadas para os cálculos das variáveis resposta

1 Biomassa Seca:

a) Cálculo da Umidade:

$$U = P_2 - P_3$$

$$P_3 = P_2 - U$$

onde:

U – umidade em gramas

P2 = peso do papel de filtro em temperatura ambiente

P3 = peso do papel de filtro depois de seco em estufa

b) Cálculo da biomassa seca:

$$BS = P_1 - P_3$$

$$BS = P_1 - P_2 + U$$

$$BS \text{ g / L} = \frac{(P_1 - P_2 + U) \cdot 1000}{50} = (P_1 - P_2 + U) \cdot 20$$

onde:

BS = Biomassa seca em 50 mg de amostra

BS g/L = biomassa seca em gramas por litro

P1 – peso do papel de filtro seco + biomassa seca

P2 – peso do papel de filtro com umidade

U - umidade

2 Percentual de Lipídios por grama de biomassa seca:

$$\frac{(T_2 - T_1) \cdots 100 \%}{B \cdots \% \text{Lipídios Totais}}$$

$$\% \text{Lipídios Totais} = \frac{(T_2 - T_1) * 100 \%}{B}$$

onde:

B = biomassa seca pesada em gramas

T₁ = peso do tubo seco e vazio

T₂ = peso do tubo com o óleo extraído

3 Miligramas de Lipídios por Litro de Meio de Cultura

$$\frac{(T_2 - T_1) \cdots B}{\text{Lipídios } g / L \cdots C}$$

$$\text{Lipídios } mg / L = \frac{(T_2 - T_1) * C \%}{B} * 1000$$

onde:

T₁ = peso do tubo seco e vazio

T₂ = peso do tubo com o óleo extraído

B = biomassa seca pesada em gramas

C = biomassa seca em gramas por litro

4 Percentual de Acilgliceróis por Lipídios Totais Extraídos

$$\text{Concentração de AG em } mg / mL = 4. \frac{(Abs_{am} - Abs_{br})}{(Abs_{pad} - Abs_{br})}$$

$$AG \text{ em } mg / g \text{ de lipídios totais} = 4. \frac{(Abs_{am} - Abs_{br})}{(Abs_{pad} - Abs_{br})} \cdot \frac{1}{B}$$

$$AG \text{ em } g / g \text{ de lipídios totais} = 4. \frac{(Abs_{am} - Abs_{br})}{(Abs_{pad} - Abs_{br})} \cdot \frac{100}{(B)} = \frac{2(Abs_{am} - Abs_{br})}{5(Abs_{pad} - Abs_{br}) \cdot (B)}$$

$$\% AG / g \text{ de lipídios totais} = \frac{2(Abs_{am} - Abs_{br})}{5(Abs_{pad} - Abs_{br}) \cdot (B)} \cdot \% L \cdot 100$$

$$\% AG / g = \frac{2 \cdot (Abs_{am} - Abs_{br})}{5 \cdot (Abs_{pad} - Abs_{br}) \cdot (B) \cdot (\% L)} \cdot 100 \%$$

onde:

%AG/g = porcentagem de acilgliceróis por lipídios totais extraídos

Absam = absorbância da amostra

Absbr = absorbância do branco

Abspad = absorbância do padrão

B = biomassa seca pesada na determinação de lipídios

% L = percentual de lipídios por grama de biomassa seca

5 Acilgliceróis em miligramas por litro de meio de cultura

$$\text{Concentração de AG em mg / mL} = 4 \cdot \frac{(Absam - Absbr)}{(Abspad - Absbr)}$$

$$AG \text{ em mg / g de lipídios totais} = 4 \cdot \frac{(Absam - Absbr)}{(Abspad - Absbr)} \cdot \frac{1}{B}$$

$$AG \text{ em g / L de meio de cultura} = 4 \cdot \frac{(Absam - Absbr)}{(Abspad - Absbr)} \cdot (B) \cdot C$$

$$AG \text{ em mg / L de meio de cultura} = 4 \cdot \frac{(Absam - Absbr) \cdot (C)}{(Abspad - Absbr) \cdot (B)} \cdot \frac{1}{1000}$$

$$AG \text{ mg / L} = \frac{(Absam - Absbr) \cdot (C)}{250 \cdot (Abspad - Absbr) \cdot (B)}$$

onde:

Absam = absorbância da amostra

Absbr = absorbância do branco

Abspad = absorbância do padrão

B = biomassa seca pesada na determinação de lipídios (g)

C = biomassa seca em (g/L)

APÊNDICE 6: Análise Estatística dos Valores Obtidos para as Variáveis Resposta no Delineamento Plackett Burman

Os resultados em negrito representam as variáveis que tiveram efeito significativo ao nível de significância de 0,1.

Tabela 5 – Análise dos Efeitos das variáveis independentes sobre a variável-resposta gramas de biomassa seca por litro de meio em 8 dias de cultivo

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t (8)	p	Lim. Conf (-90%)	Lim. Conf (+90%)
Mean/Interc	0,641	0,048	13,357	0,000	0,547	0,734
Nitrogênio	0,051	0,111	0,457	0,664	-0,165	0,267
Fósforo	0,287	0,111	2,582	0,042	0,071	0,504
Ferro	0,036	0,111	0,323	0,758	-0,180	0,252
Silício	0,090	0,111	0,807	0,451	-0,126	0,306
Glicerol	0,029	0,111	0,263	0,801	-0,187	0,245

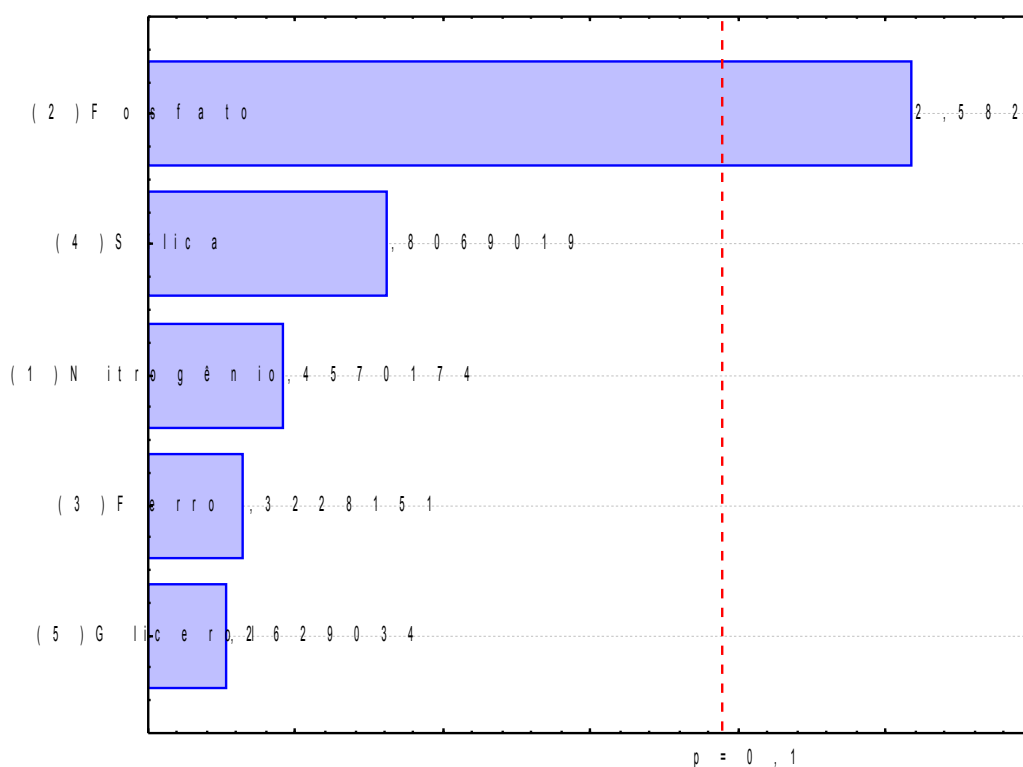


Gráfico 16 – Gráfico de Pareto mostrando os efeitos das variáveis independentes sobre a variável resposta gramas de biomassa seca por litro de meio em 8 dias de cultivo

Tabela 6 – Análise dos Efeitos das variáveis independentes sobre a variável-resposta gramas de biomassa seca por litro de meio em 10 dias de cultivo

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t (8)	p	Lim. Conf (-90%)	Lim. Conf (+90%)
Mean/Interc	0,681	0,054	12,550	0,000	0,575	0,786
Nitrogênio	0,069	0,126	0,546	0,605	-0,176	0,313
Fósforo	0,261	0,126	2,073	0,084	0,016	0,505
Ferro	0,018	0,126	0,141	0,893	-0,227	0,262
Silício	0,055	0,126	0,434	0,679	-0,190	0,299
Glicerol	0,028	0,126	0,224	0,830	-0,216	0,273

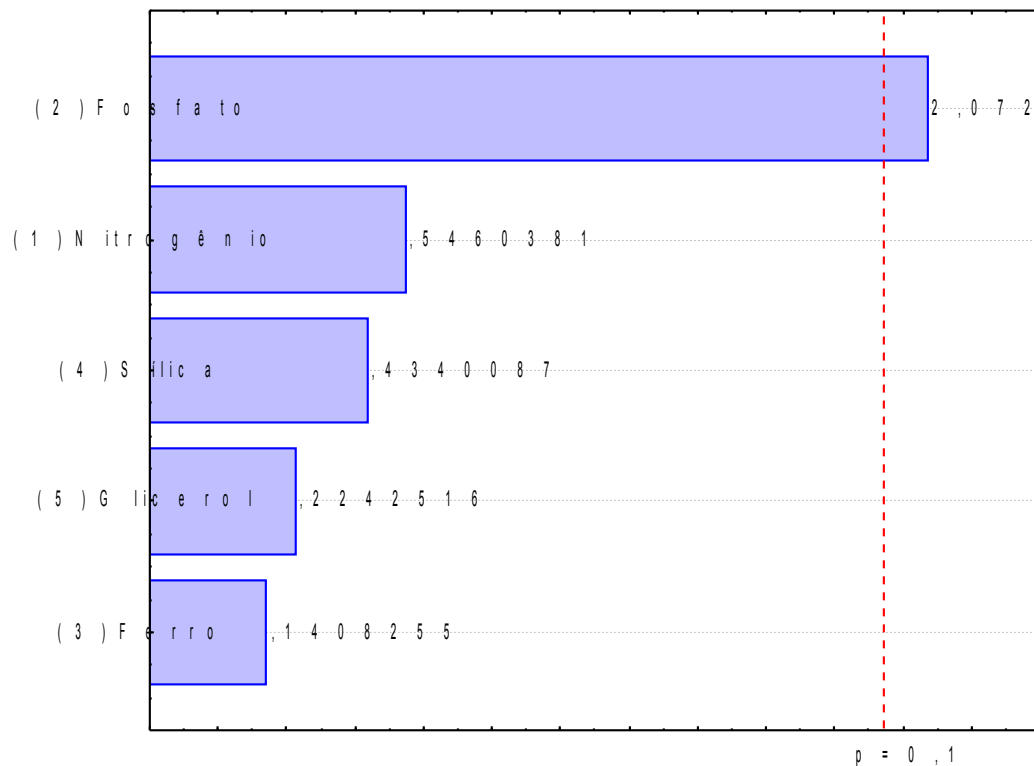


Gráfico 17 – Gráfico de Pareto mostrando os efeitos das variáveis independentes sobre a variável resposta gramas de biomassa seca por litro de meio em 10 dias de cultivo

Tabela 7 – Análise dos efeitos das variáveis independentes sobre a variável-resposta gramas de biomassa seca por litro de meio em 12 dias de cultivo

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t (8)	p	Lim. Conf (-90%)	Lim. Conf (+90%)
Mean/Interc	0,684	0,044	15,613	0,000	0,599	0,770
Nitrogênio	0,087	0,102	0,859	0,423	-0,110	0,285
Fósforo	0,238	0,102	2,339	0,058	0,040	0,436
Ferro	0,038	0,102	0,373	0,722	-0,160	0,236
Silício	0,064	0,102	0,630	0,552	-0,134	0,262
Glicerol	0,048	0,102	0,470	0,655	-0,150	0,245

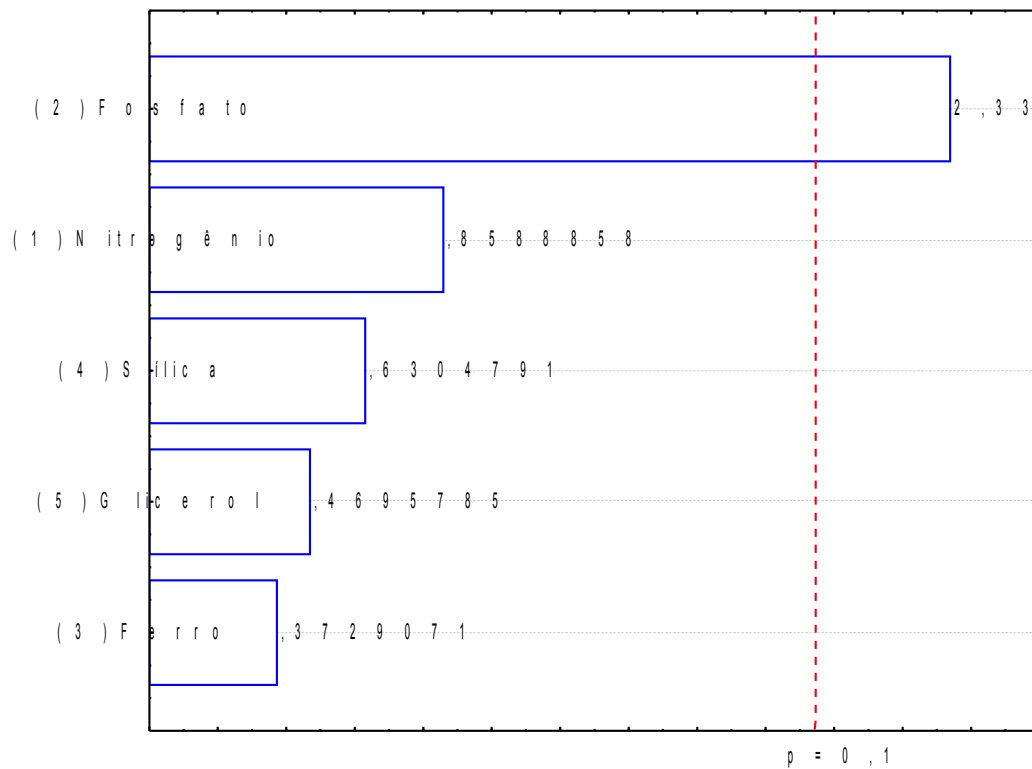


Gráfico 18 – Gráfico de Pareto mostrando os efeitos das variáveis independentes sobre a variável resposta gramas de biomassa seca por litro de meio em 12 dias de cultivo

Tabela 8 – Análise dos efeitos das variáveis independentes sobre a variável-resposta gramas de biomassa seca por litro de meio em 15 dias de cultivo

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t (8)	p	Lim. Conf (-90%)	Lim. Conf (+90%)
Mean/Interc	0,689	0,043	15,871	0,000	0,605	0,774
Nitrogênio	0,053	0,101	0,523	0,620	-0,143	0,248
Fósforo	0,234	0,101	2,320	0,059	0,038	0,430
Ferro	0,060	0,101	0,591	0,576	-0,136	0,255
Silício	0,025	0,101	0,247	0,813	-0,171	0,221
Glicerol	0,015	0,101	0,154	0,883	-0,180	0,211

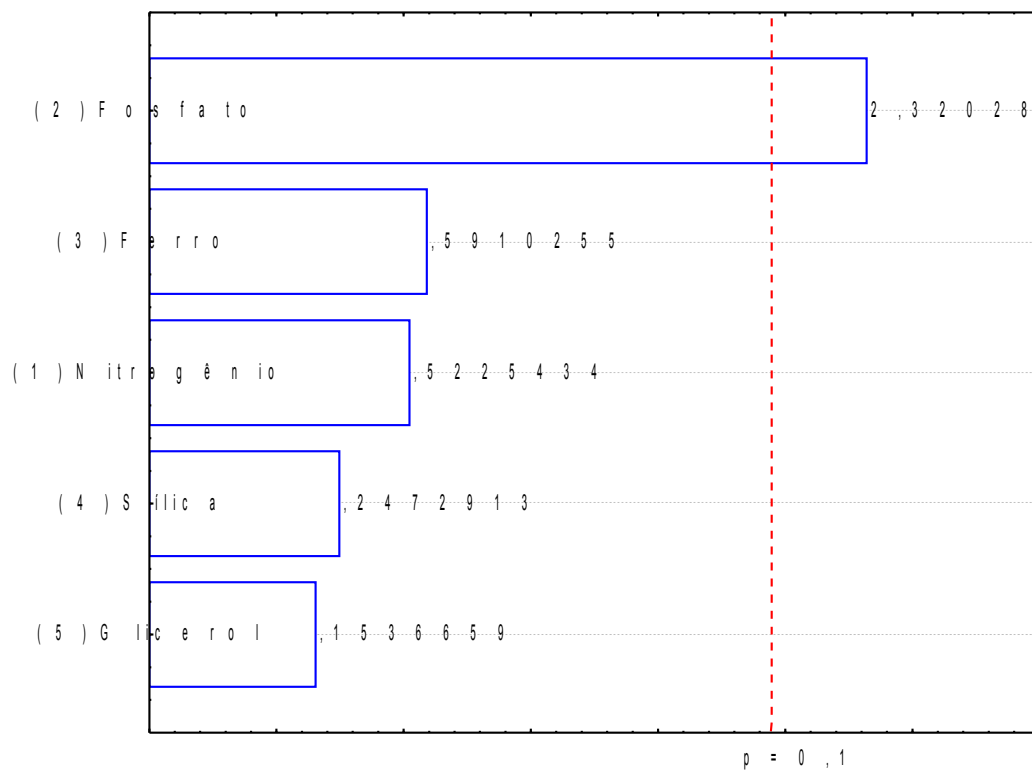


Gráfico 19 – Gráfico de Pareto mostrando os efeitos das variáveis independentes sobre a variável resposta gramas de biomassa seca por litro de meio em 15 dias de cultivo

Tabela 9 – Análise dos efeitos das variáveis independentes sobre a variável-resposta percentual de lipídios por grama de biomassa seca em 8 dias de cultivo

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t (8)	p	Lim. Conf (-90%)	Lim. Conf (+90%)
Mean/Interc	6,694	0,509	13,147	0,000	5,705	7,684
Nitrogênio	1,823	1,182	1,543	0,174	-0,473	4,119
Fósforo	-1,283	1,182	-1,086	0,319	-3,579	1,013
Ferro	-1,046	1,182	-0,885	0,410	-3,342	1,250
Silício	0,001	1,182	0,001	0,999	-2,295	2,297
Glicerol	-0,683	1,182	-0,578	0,584	-2,979	1,613

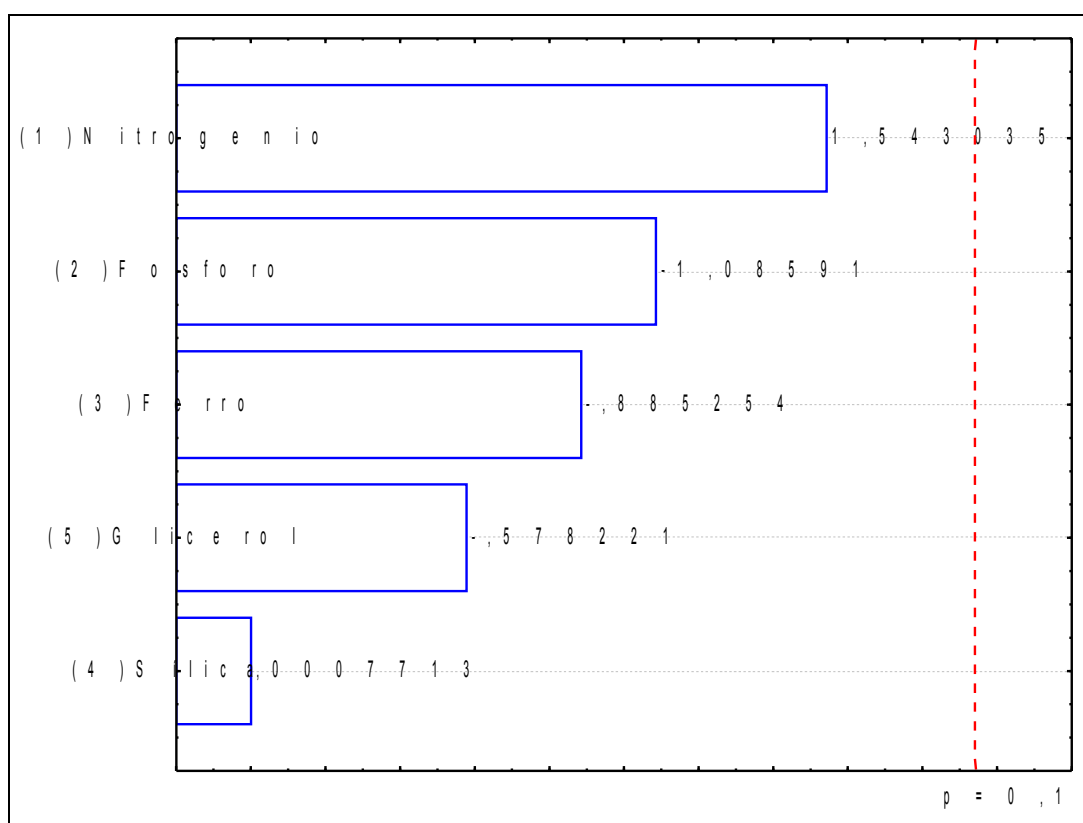


Gráfico 20 – Gráfico de Pareto mostrando os efeitos das variáveis independentes sobre a variável resposta percentual de lipídios por grama de biomassa seca em 8 dias de cultivo

Tabela 10 – Análise dos efeitos das variáveis independentes sobre a variável-resposta percentual de lipídios por grama de biomassa seca em 10 dias de cultivo

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t (8)	p	Lim. Conf (-90%)	Lim. Conf (+90%)
Mean/Interc	7.877	0.571	13.785	0.000	6.767	8.988
Nitrogênio	1.769	1.326	1.334	0.231	-0.807	4.346
Fósforo	-0.014	1.326	-0.011	0.992	-2.591	2.562
Ferro	0.475	1.326	0.358	0.732	-2.102	3.052
Silício	-0.148	1.326	-0.111	0.915	-2.724	2.429
Glicerol	0.266	1.326	0.201	0.848	-2.311	2.843

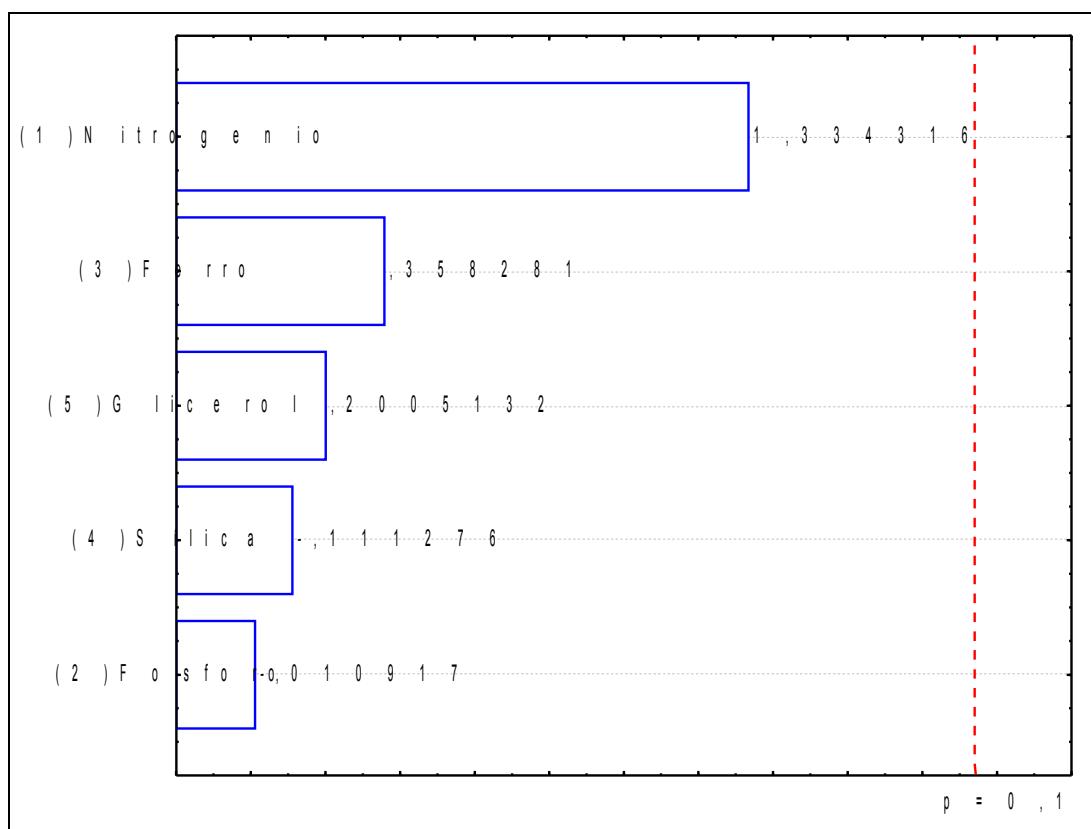


Gráfico 21 – Gráfico de Pareto mostrando os efeitos das variáveis independentes sobre a variável resposta percentual de lipídios por grama de biomassa seca em 10 dias de cultivo

Tabela 11 – Análise dos efeitos das variáveis independentes sobre a variável-resposta percentual de lipídios por grama de biomassa seca em 12 dias de cultivo

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t (8)	p	Lim. Conf (-90%)	Lim. Conf (+90%)
Mean/Interc	12.794	0.980	13.049	0.000	10.889	14.699
Nitrogênio	-0.552	2.275	-0.243	0.816	-4.973	3.868
Fósforo	-0.469	2.275	-0.206	0.843	-4.890	3.952
Ferro	-0.160	2.275	-0.070	0.946	-4.581	4.261
Silício	-1.846	2.275	-0.811	0.448	-6.266	2.575
Glicerol	-0.414	2.275	-0.182	0.862	-4.834	4.007

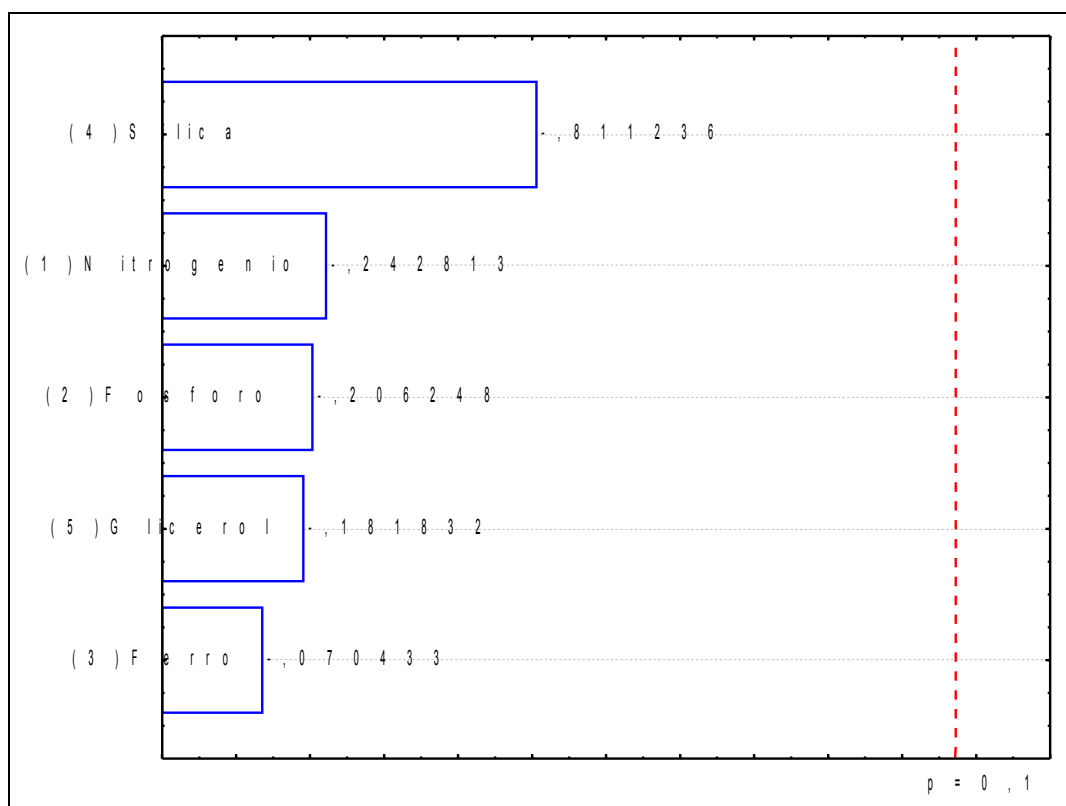


Gráfico 22 – Gráfico de Pareto mostrando os efeitos das variáveis independentes sobre a variável resposta percentual de lipídios por grama de biomassa seca em 12 dias de cultivo

Tabela 12 – Análise dos efeitos das variáveis independentes sobre a variável-resposta percentual de lipídios por grama de biomassa seca em 15 dias de cultivo

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t (8)	p	Lim. Conf (-90%)	Lim. Conf (+90%)
Mean/Interc	15.210	0.672	22.639	0.000	13.905	16.516
Nitrogênio	-0.621	1.559	-0.399	0.704	-3.651	2.408
Fósforo	0.359	1.559	0.230	0.826	-2.670	3.388
Ferro	0.172	1.559	0.110	0.916	-2.858	3.201
Silício	0.123	1.559	0.079	0.940	-2.906	3.153
Glicerol	-2.313	1.559	-1.483	0.188	-5.342	0.717

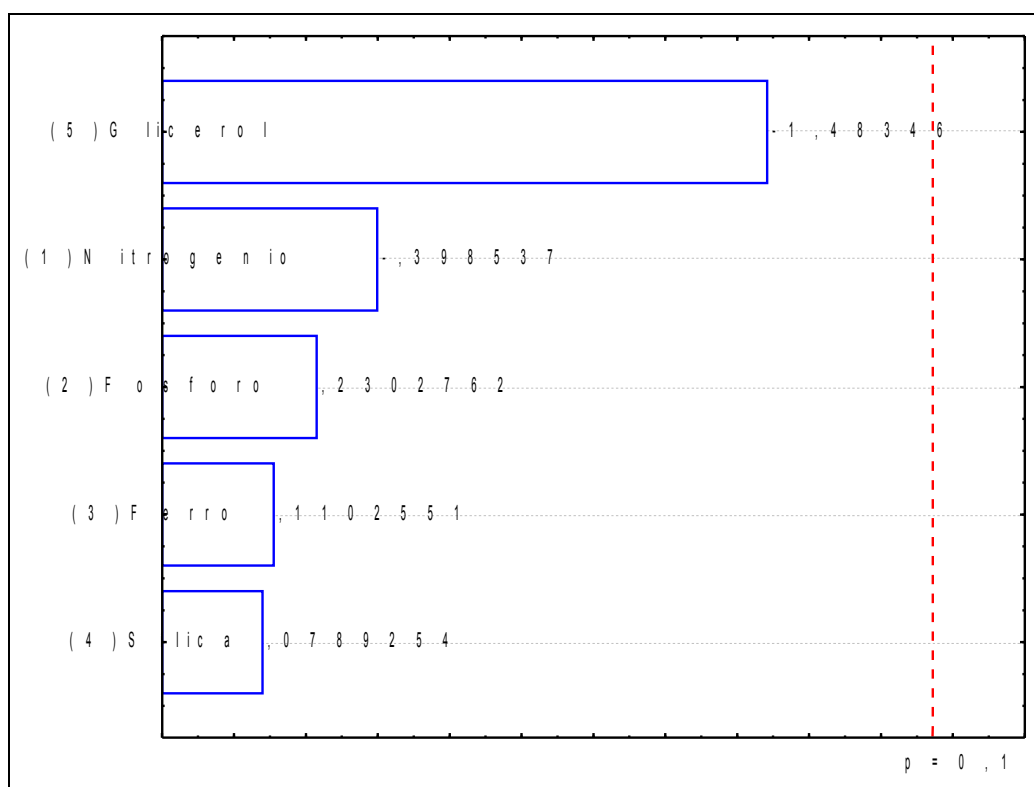


Gráfico 23 – Gráfico de Pareto mostrando os efeitos das variáveis independentes sobre a variável resposta percentual de lipídios por grama de biomassa seca em 15 dias de cultivo

Tabela 13 – Análise dos efeitos das variáveis independentes sobre a variável-resposta miligramas de lipídios por litro de meio de cultura em 8 dias de cultivo

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t (8)	p	Lim. Conf (-90%)	Lim. Conf (+90%)
Mean/Interc	41.847	3.144	13.309	0.000	35.737	47.957
Nitrogênio	14.520	7.296	1.990	0.094	0.342	28.698
Fósforo	12.802	7.296	1.755	0.130	-1.376	26.980
Ferro	-1.956	7.296	-0.268	0.798	-16.134	12.222
Silício	4.710	7.296	0.645	0.542	-9.469	18.888
Glicerol	-0.866	7.296	-0.119	0.909	-15.044	13.312

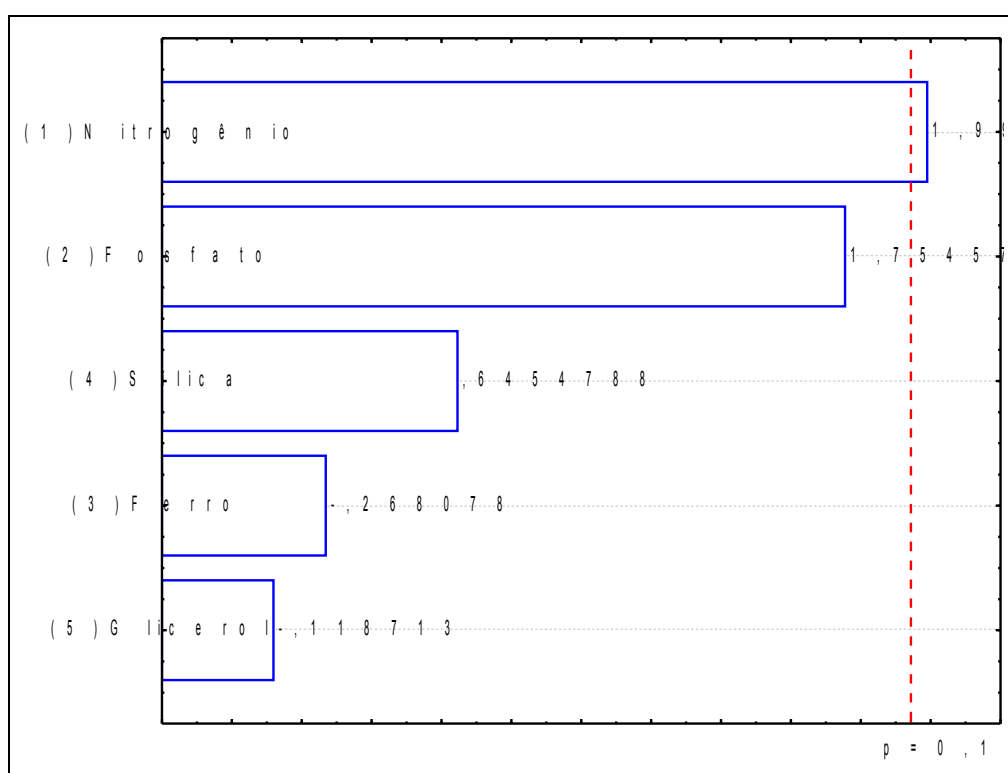


Gráfico 24 – Gráfico de Pareto mostrando os efeitos das variáveis independentes sobre a variável resposta miligramas de lipídios por litro de meio de cultura em 8 dias de cultivo

Tabela 15 – Análise dos efeitos das variáveis independentes sobre a variável-resposta miligramas de lipídios por litro de meio de cultura em 10 dias de cultivo

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t (8)	p	Lim. Conf (-90%)	Lim. Conf (+90%)
Mean/Interc	55.637	9.061	6.140	0.001	38.030	73.244
Nitrogênio	15.803	21.025	0.752	0.481	-25.053	56.659
Fósforo	18.037	21.025	0.858	0.424	-22.819	58.893
Ferro	4.329	21.025	0.206	0.844	-36.527	45.184
Silício	1.242	21.025	0.059	0.955	-39.614	42.098
Glicerol	3.088	21.025	0.147	0.888	-37.768	43.943

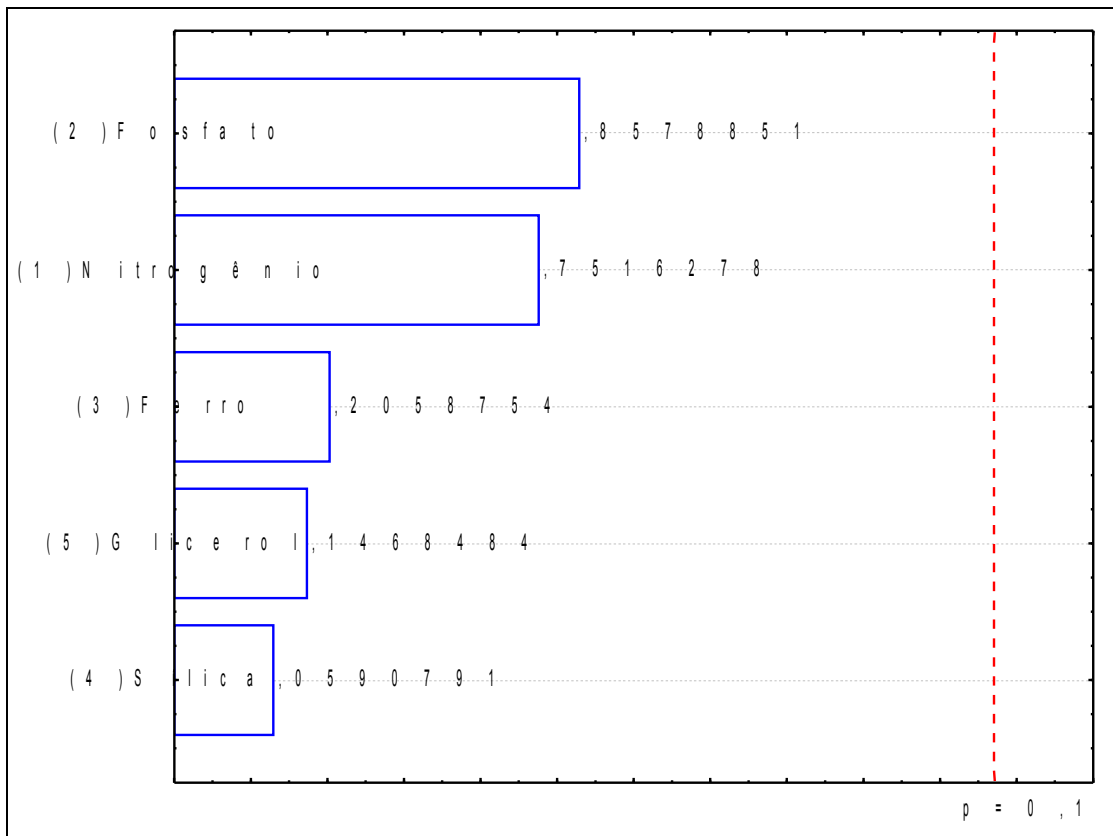


Gráfico 25 – Gráfico de Pareto mostrando os efeitos das variáveis independentes sobre a variável resposta miligramas de lipídios por litro de meio de cultura em 10 dias de cultivo

Tabela 16 – Análise dos efeitos das variáveis independentes sobre a variável-resposta miligramas de lipídios por litro de meio de cultura em 12 dias de cultivo

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t (8)	p	Lim. Conf (-95%)	Lim. Conf (+95%)
Mean/Interc	87.499	11.972	7.308	0.000	64.235	110.764
Nitrogênio	13.993	27.781	0.504	0.632	-39.991	67.978
Fósforo	30.727	27.781	1.106	0.311	-23.258	84.711
Ferro	10.180	27.781	0.366	0.727	-43.804	64.165
Silício	2.592	27.781	0.093	0.929	-51.392	56.576
Glicerol	9.277	27.781	0.334	0.750	-44.708	63.261

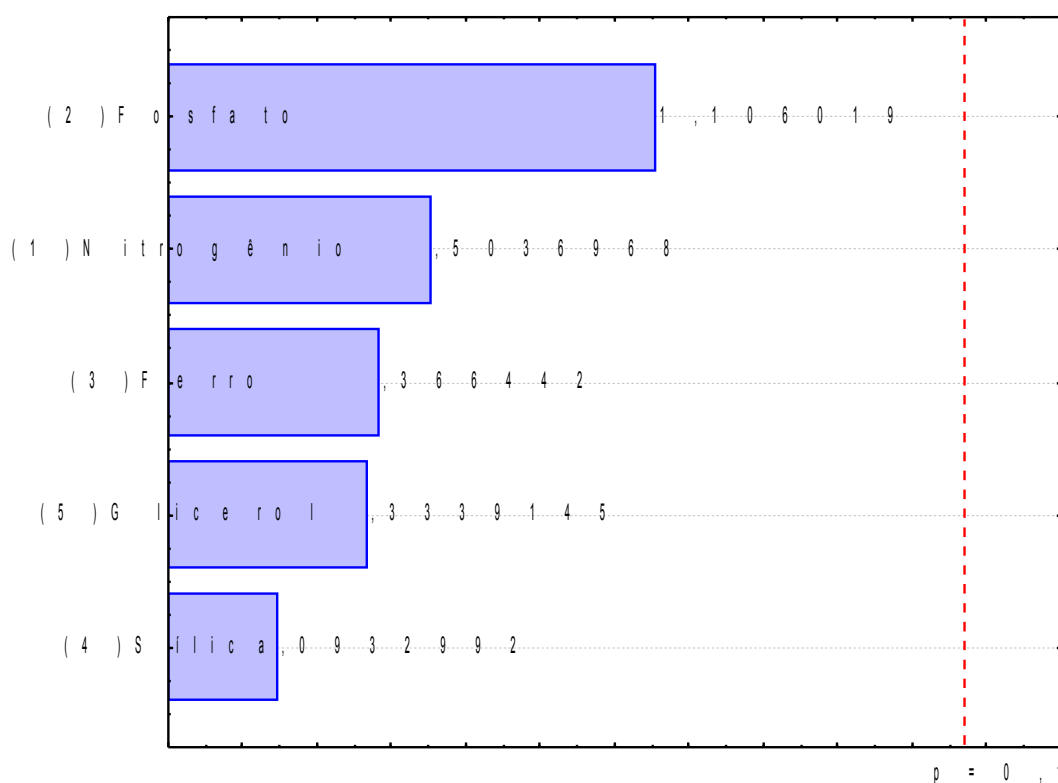


Gráfico 26 – Gráfico de Pareto mostrando os efeitos das variáveis independentes sobre a variável resposta miligramas de lipídios por litro de meio de cultura em 12 dias de cultivo

Tabela 17 – Análise dos efeitos das variáveis independentes sobre a variável-resposta miligramas de lipídios por litro de meio de cultura em 15 dias de cultivo

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t (8)	p	Lim. Conf (-95%)	Lim. Conf (+95%)
Mean/Interc	104.231	8.664	12.030	0.000	87.395	121.067
Nitrogênio	7.875	20.105	0.392	0.709	-31.192	46.943
Fósforo	42.159	20.105	2.097	0.081	3.092	81.226
Ferro	16.369	20.105	0.814	0.447	-22.698	55.436
Silício	9.746	20.105	0.485	0.645	-29.322	48.813
Glicerol	-7.536	20.105	-0.375	0.721	-46.603	31.531

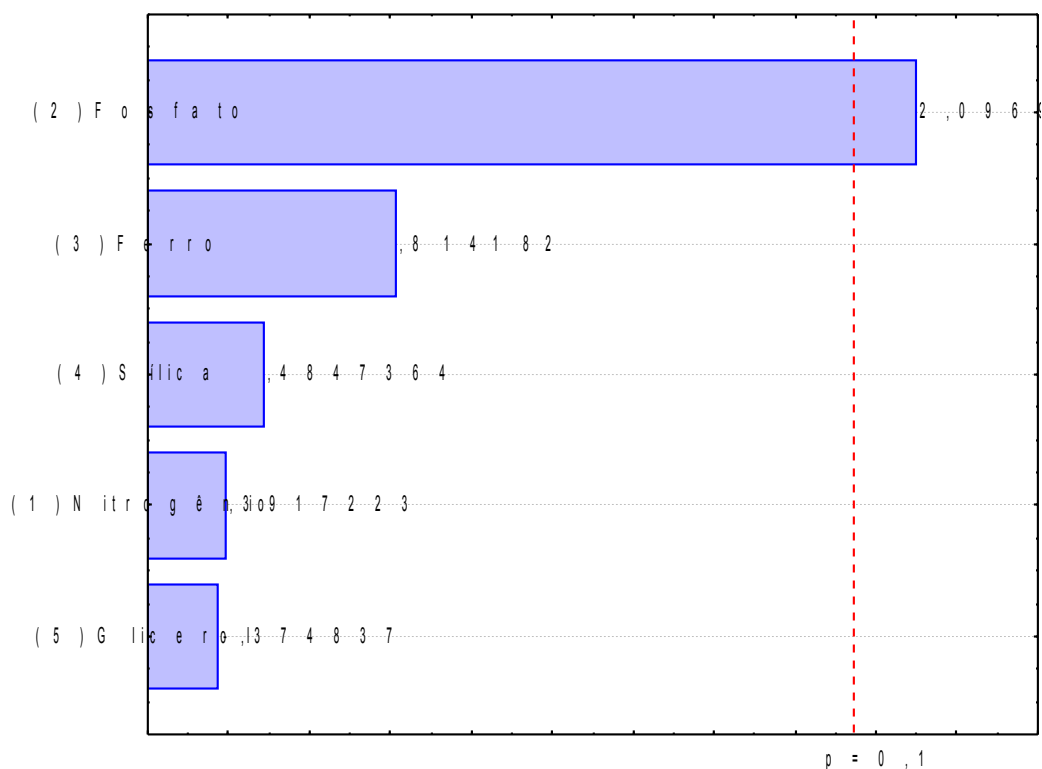


Gráfico 27 – Gráfico de Pareto mostrando os efeitos das variáveis independentes sobre a variável resposta miligramas de lipídios por litro de meio de cultura em 15 dias de cultivo

Tabela 18 – Análise dos efeitos das variáveis independentes sobre a variável-resposta miligramas de acilgliceróis por litro de meio em 8 dias de cultivo

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t (8)	p	Lim. Conf (-95%)	Lim. Conf (+95%)
Mean/Interc	33,003	2,484	13,284	0,000	26,924	39,082
Nitrogênio	11,843	5,765	2,054	0,086	-2,263	25,950
Fósforo	10,269	5,765	1,781	0,125	-3,837	24,376
Ferro	-1,788	5,765	-0,310	0,767	-15,895	12,318
Silício	8,460	5,765	1,468	0,193	-5,646	22,567
Glicerol	-4,318	5,765	-0,749	0,482	-18,424	9,789

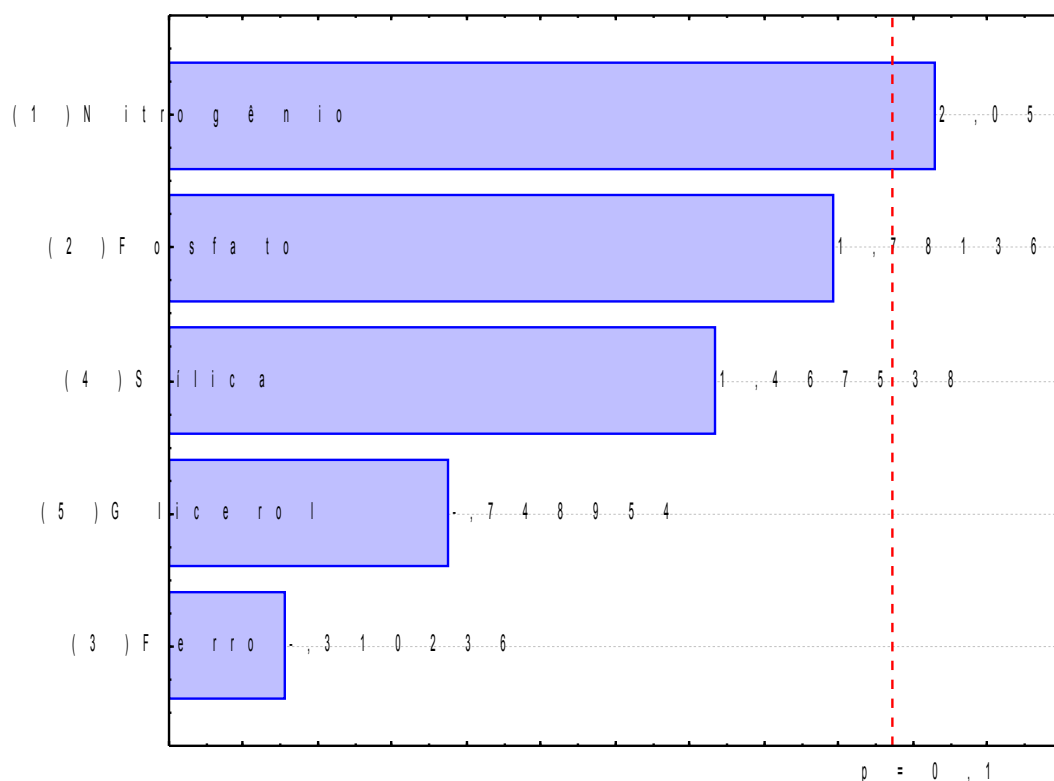


Gráfico 28 – Gráfico de Pareto mostrando os efeitos das variáveis independentes sobre a variável-resposta miligramas de acilgliceróis por litro de meio em 8 dias de cultivo

Tabela 19 – Análise dos efeitos das variáveis independentes sobre a variável-resposta miligramas de acilgliceróis por litro de meio em 10 dias de cultivo

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t (8)	p	Lim. Conf (-95%)	Lim. Conf (+95%)
Mean/Interc	37,435	4,421	8,467	0,000	28,843	46,026
Nitrogênio	9,085	10,260	0,886	0,410	-10,851	29,022
Fósforo	8,688	10,260	0,847	0,430	-11,248	28,625
Ferro	1,473	10,260	0,144	0,891	-18,464	21,409
Silício	2,072	10,260	0,202	0,847	-17,865	22,008
Glicerol	1,710	10,260	0,167	0,873	-18,227	21,646

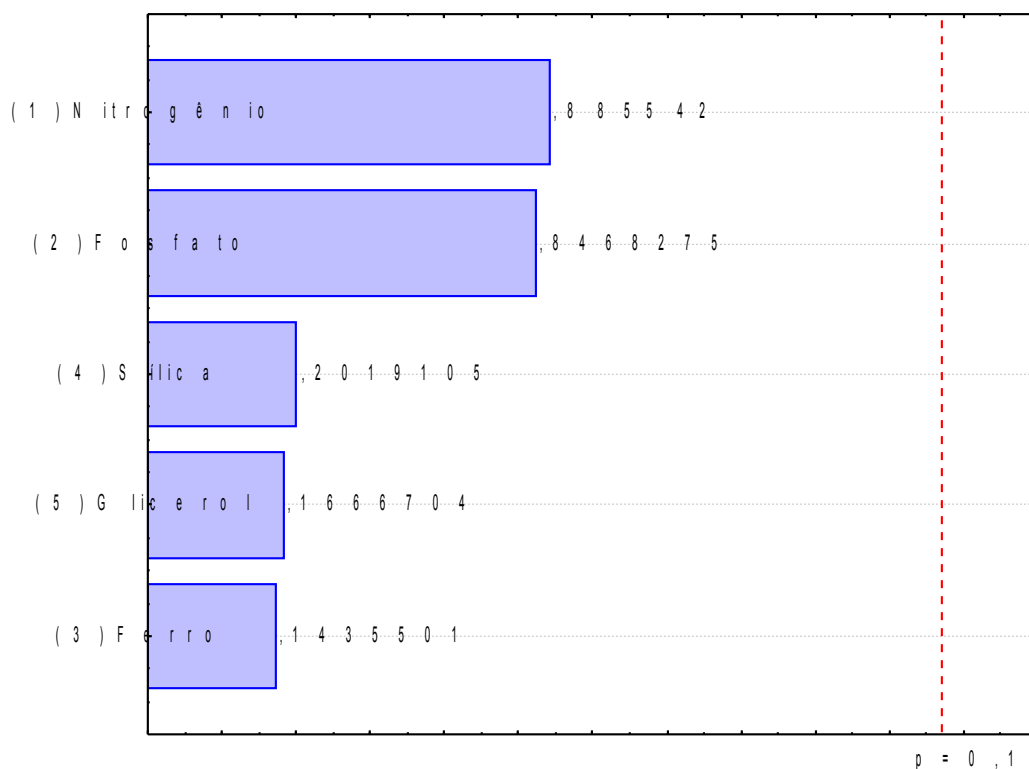


Gráfico 29 – Gráfico de Pareto mostrando os efeitos das variáveis independentes sobre a variável-resposta miligramas de acilgliceróis por litro de meio em 10 dias de cultivo

Tabela 20 – Análise dos efeitos das variáveis independentes sobre a variável-resposta miligramas de acilgliceróis por litro de meio em 12 dias de cultivo

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t (8)	p	Lim. Conf (-95%)	Lim. Conf (+95%)
Mean/Interc	36,079	2,401	15,030	0,000	31,415	40,744
Nitrogênio	13,191	5,570	2,368	0,056	2,367	24,015
Fósforo	5,234	5,570	0,940	0,384	-5,590	16,059
Ferro	-4,051	5,570	-0,727	0,494	-14,875	6,773
Silício	9,284	5,570	1,667	0,147	-1,540	20,109
Glicerol	-5,375	5,570	-0,965	0,372	-16,200	5,449

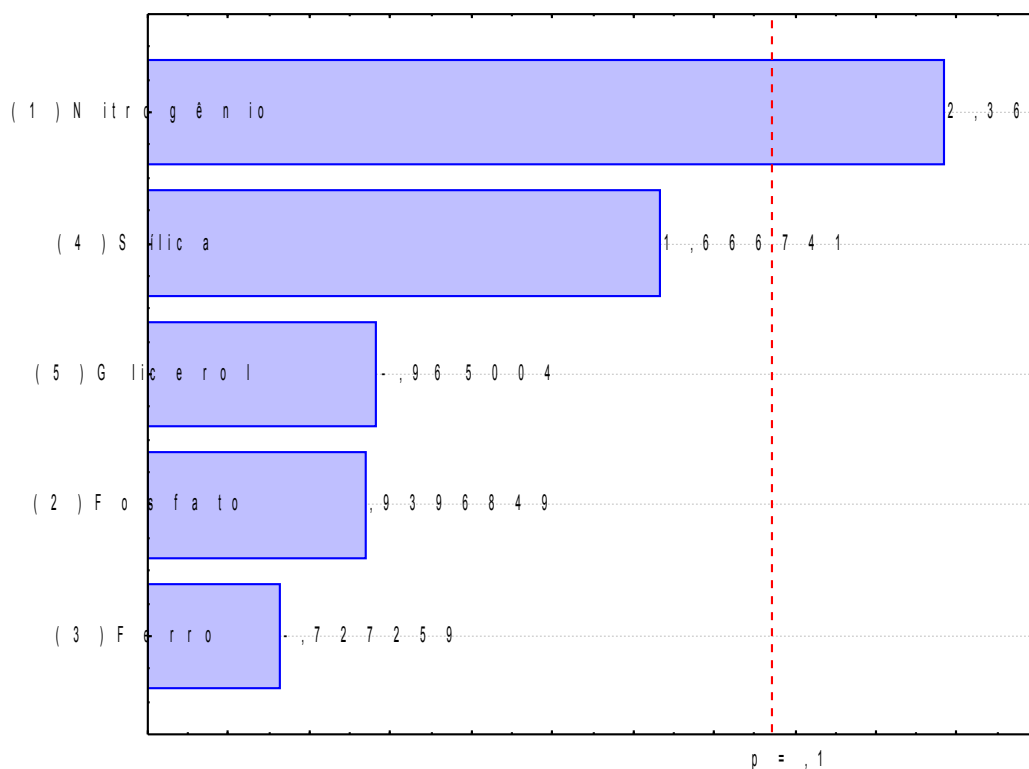


Gráfico 30 – Gráfico de Pareto mostrando os efeitos das variáveis independentes sobre a variável-resposta miligramas de acilgliceróis por litro de meio em 12 dias de cultivo

Tabela 21 – Análise dos efeitos das variáveis independentes sobre a variável-resposta miligramas de acilgliceróis por litro de meio em 15 dias de cultivo

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t (8)	p	Lim. Conf (-95%)	Lim. Conf (+95%)
Mean/Interc	35,767	2,159	16,569	0,000	31,573	39,962
Nitrogênio	11,079	5,009	2,212	0,069	1,346	20,812
Fósforo	5,610	5,009	1,120	0,306	-4,123	15,344
Ferro	-2,483	5,009	-0,496	0,638	-12,216	7,250
Silício	7,082	5,009	1,414	0,207	-2,651	16,815
Glicerol	-6,489	5,009	-1,295	0,243	-16,222	3,245

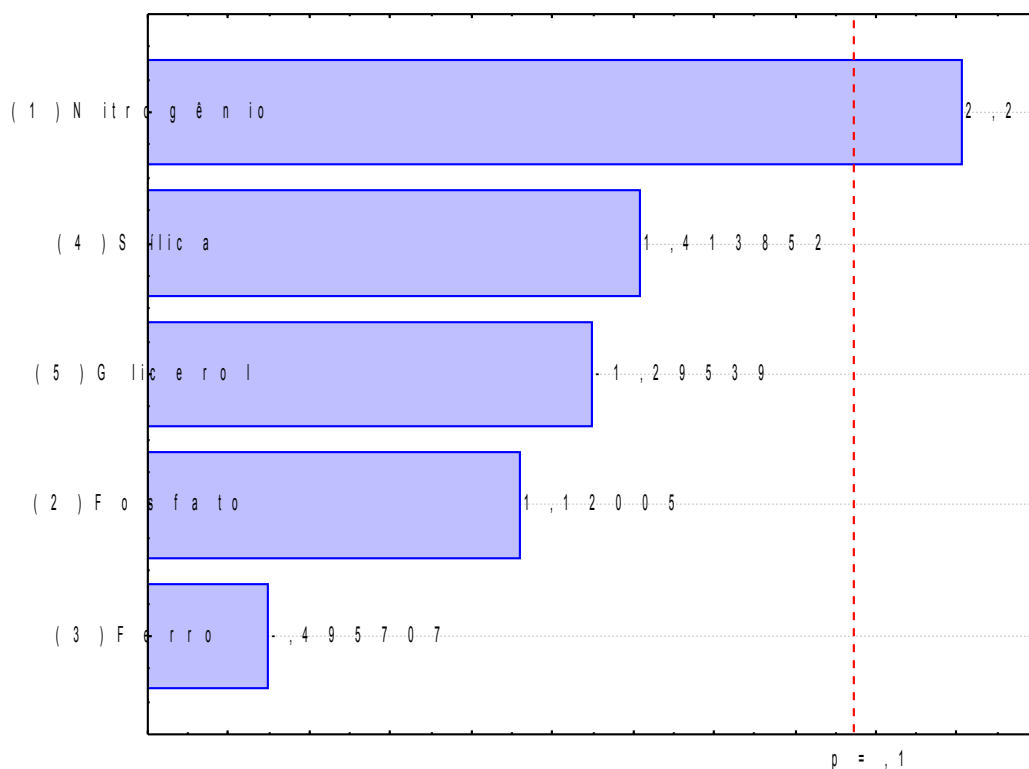


Gráfico 31 – Gráfico de Pareto mostrando os efeitos das variáveis independentes sobre a variável-resposta miligramas de acilgliceróis por litro de meio em 15 dias de cultivo

Tabela 22 – Análise dos efeitos das variáveis independentes sobre a variável-resposta percentual de acilgliceróis nos lipídios totais extraídos em 8 dias de cultivo

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t (8)	p	Lim. Conf (-95%)	Lim. Conf (+95%)
Mean/Interc	79,002	2,670	29,585	0,000	73,813	84,191
Nitrogênio	2,153	6,196	0,347	0,740	-9,888	14,194
Fósforo	1,474	6,196	0,238	0,820	-10,567	13,514
Ferro	-2,706	6,196	-0,437	0,678	-14,746	9,335
Silício	11,816	6,196	1,907	0,105	-0,225	23,857
Glicerol	-10,341	6,196	-1,669	0,146	-22,382	1,700

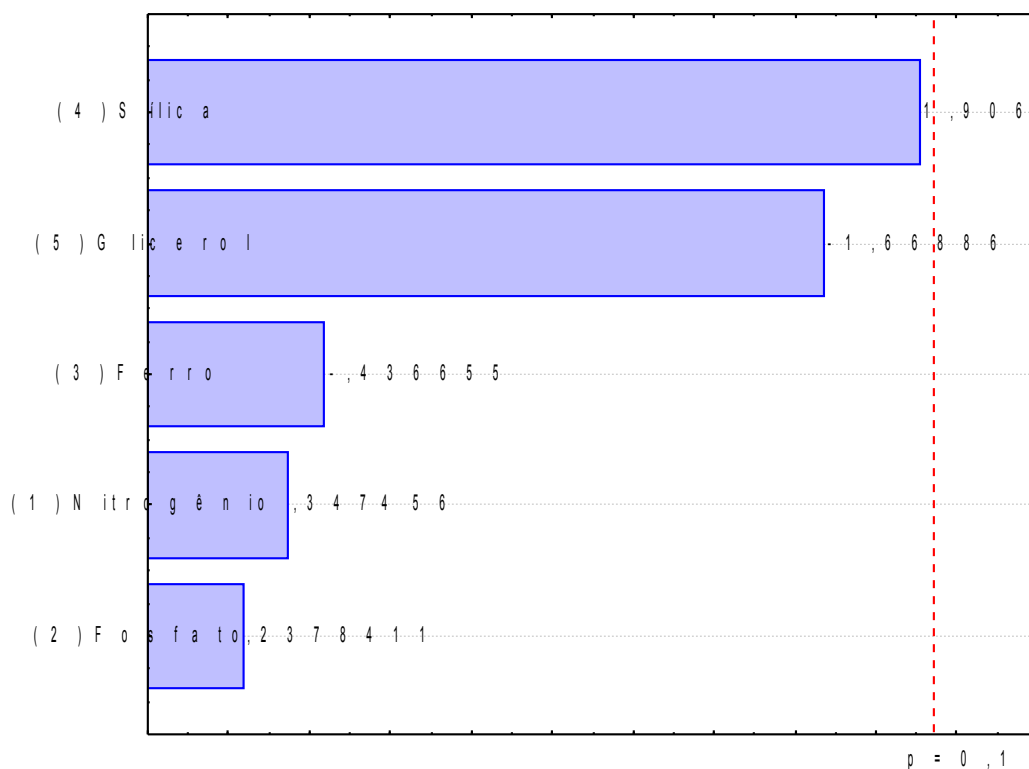


Gráfico 32 – Gráfico de Pareto mostrando os efeitos das variáveis independentes sobre a variável-resposta percentual de acilgliceróis nos lipídios totais extraídos em 8 dias de cultivo

Tabela 23 – Análise dos efeitos das variáveis independentes sobre a variável-resposta percentual de acilgliceróis nos lipídios totais extraídos em 10 dias de cultivo

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t (8)	p	Lim. Conf (-95%)	Lim. Conf (+95%)
Mean/Interc	70,390	4,260	16,525	0,000	62,113	78,667
Nitrogênio	-2,515	9,884	-0,254	0,808	-21,722	16,693
Fósforo	-7,500	9,884	-0,759	0,477	-26,707	11,707
Ferro	-1,349	9,884	-0,137	0,896	-20,557	17,858
Silício	5,655	9,884	0,572	0,588	-13,552	24,862
Glicerol	3,526	9,884	0,357	0,734	-15,682	22,733

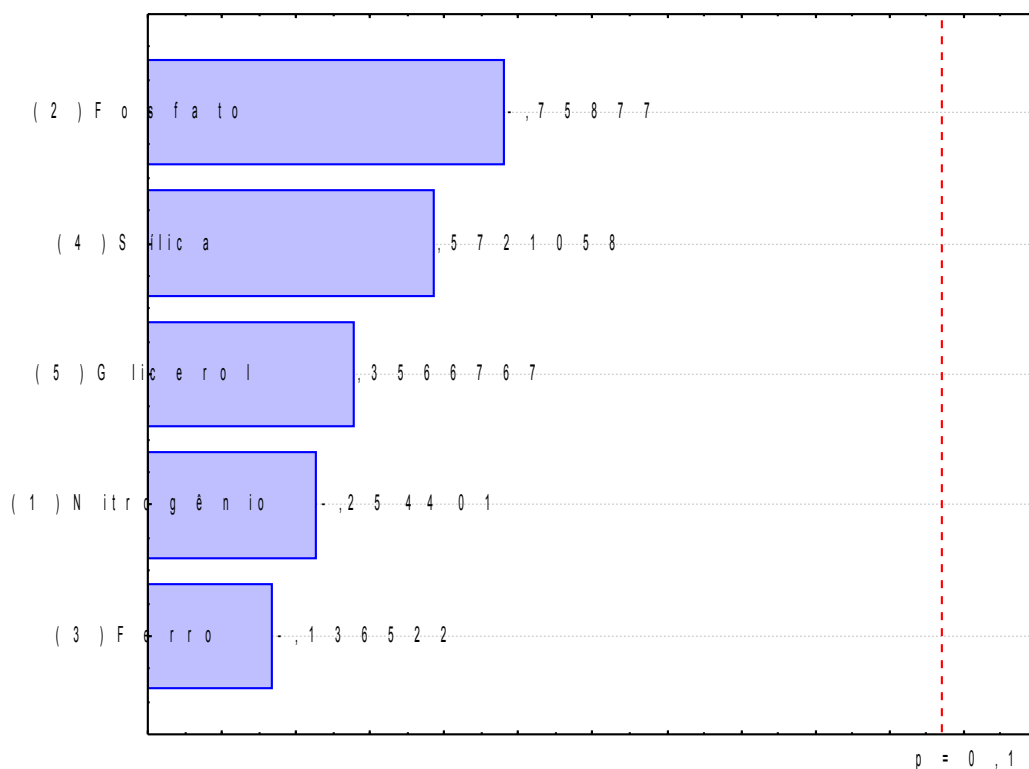


Gráfico 33 – Gráfico de Pareto mostrando os efeitos das variáveis independentes sobre a variável-resposta percentual de acilgliceróis nos lipídios totais extraídos em 8 dias de cultivo

Tabela 24 – Análise dos efeitos das variáveis independentes sobre a variável-resposta percentual de acilgliceróis nos lipídios totais extraídos em 12 dias de cultivo

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t (8)	p	Lim. Conf (-95%)	Lim. Conf (+95%)
Mean/Interc	45,088	5,845	7,714	0,000	33,730	56,446
Nitrogênio	16,608	13,564	1,224	0,267	-9,749	42,964
Fósforo	-12,681	13,564	-0,935	0,386	-39,038	13,676
Ferro	-13,677	13,564	-1,008	0,352	-40,033	12,680
Silício	18,409	13,564	1,357	0,224	-7,948	44,766
Glicerol	-15,959	13,564	-1,177	0,284	-42,315	10,398

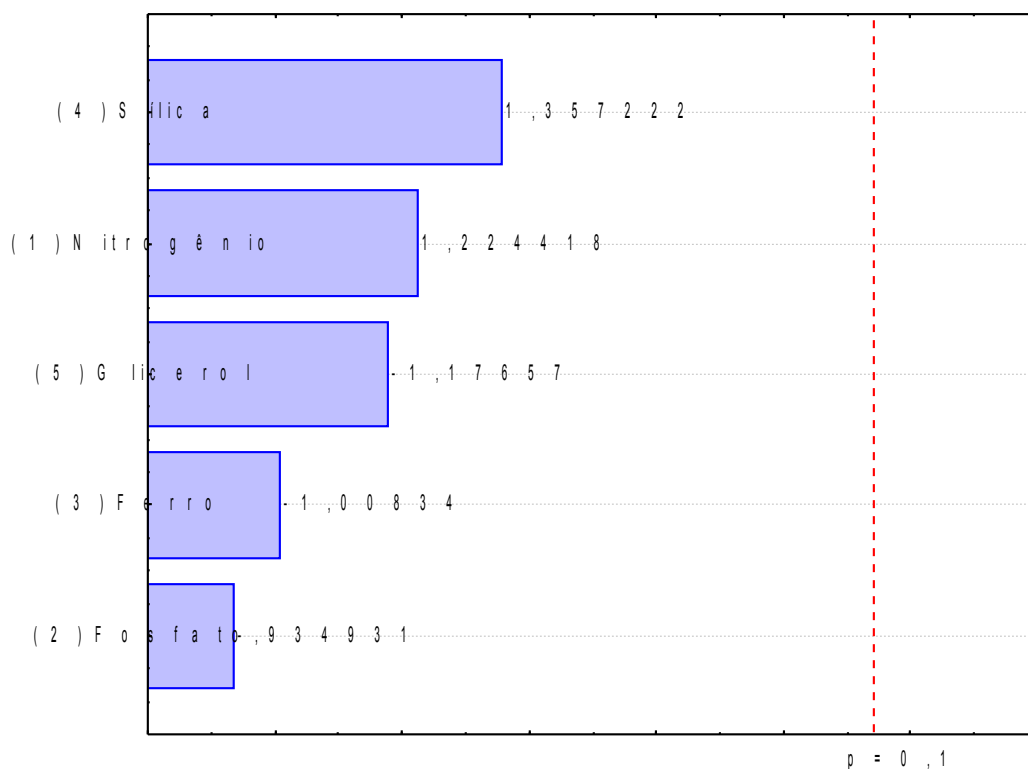


Gráfico 34 – Gráfico de Pareto mostrando os efeitos das variáveis independentes sobre a variável-resposta percentual de acilgliceróis nos lipídios totais extraídos em 12 dias de cultivo

Tabela 25 – Análise dos efeitos das variáveis independentes sobre a variável-resposta percentual de acilgliceróis nos lipídios totais extraídos em 15 dias de cultivo

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t (8)	p	Lim. Conf (-95%)	Lim. Conf (+95%)
Mean/Interc	35,578	2,696	13,195	0,000	30,339	40,818
Nitrogênio	10,089	6,257	1,613	0,158	-2,069	22,247
Fósforo	-9,394	6,257	-1,502	0,184	-21,552	2,763
Ferro	-8,579	6,257	-1,371	0,219	-20,736	3,579
Silício	6,730	6,257	1,076	0,323	-5,427	18,888
Glicerol	-5,572	6,257	-0,891	0,407	-17,730	6,586

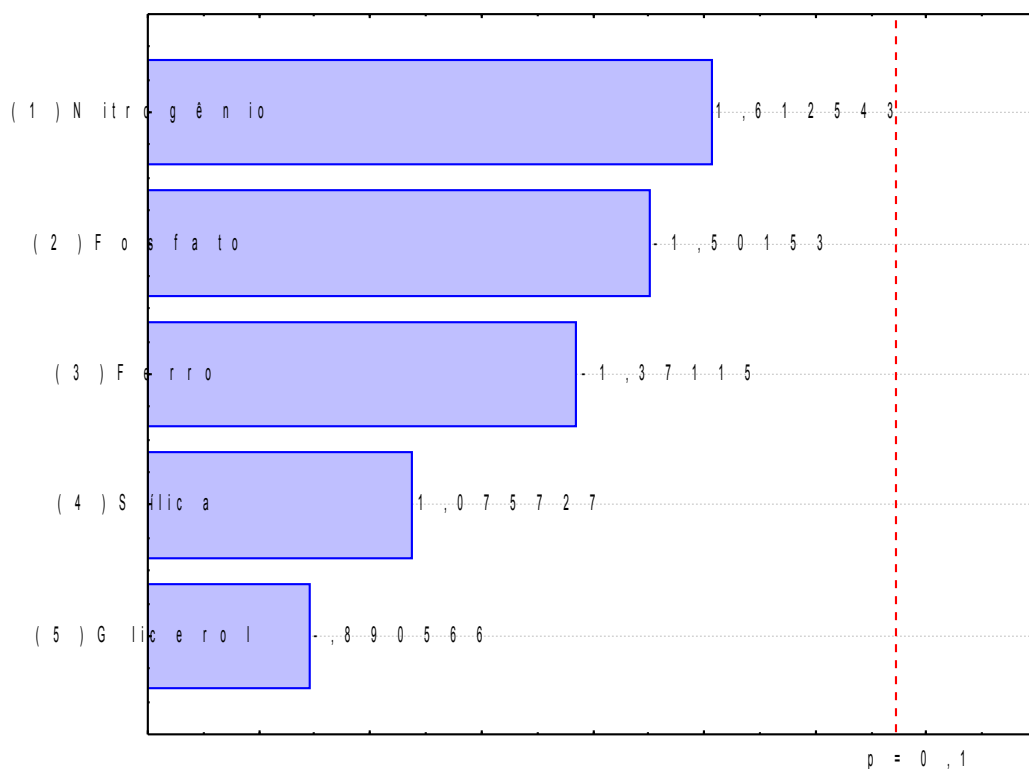


Gráfico 35 – Gráfico de Pareto mostrando os efeitos das variáveis independentes sobre a variável-resposta percentual de acilgliceróis nos lipídios totais extraídos em 15 dias de cultivo

APÊNDICE 7: Análise Estatística dos Valores Obtidos para as Variáveis Resposta no Delineamento Composto Central Rotacionado

Os resultados em negrito representam as variáveis que tiveram efeito significativo ao nível de significância de 0,5.

Tabela 26 – Análise dos efeitos das variáveis independentes sobre a variável-resposta gramas de biomassa seca por litro de meio de cultura em 8 dias de cultivo

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t (8)	p	Lim. Conf (-95%)	Lim. Conf (+95%)
Mean/Interc	0,781	0,038	20,512	0,000	0,693	0,869
Nitrogênio (L)	0,151	0,041	3,667	0,006	0,056	0,247
Nitrogênio (Q)	-0,036	0,043	-0,847	0,422	-0,135	0,063
Fósforo (L)	0,394	0,041	9,532	0,000	0,298	0,489
Fósforo (Q)	-0,057	0,043	-1,326	0,222	-0,156	0,042
Glicerol (L)	0,121	0,041	2,929	0,019	0,026	0,216
Glicerol (Q)	-0,081	0,043	-1,892	0,095	-0,180	0,018
1L x 2L	0,102	0,054	1,892	0,095	-0,022	0,226
1L x 3L	0,057	0,054	1,057	0,321	-0,067	0,181
2L x 3L	-0,014	0,054	-0,266	0,797	-0,139	0,110

(L) – linear, (Q) – quadrático, 1L x 2L – interação entre os termos lineares do nitrogênio e do fósforo, 1L x 3L – interação entre os termos lineares do nitrogênio e do glicerol, 2L x 3L – interação entre os termos lineares do fósforo e do glicerol.

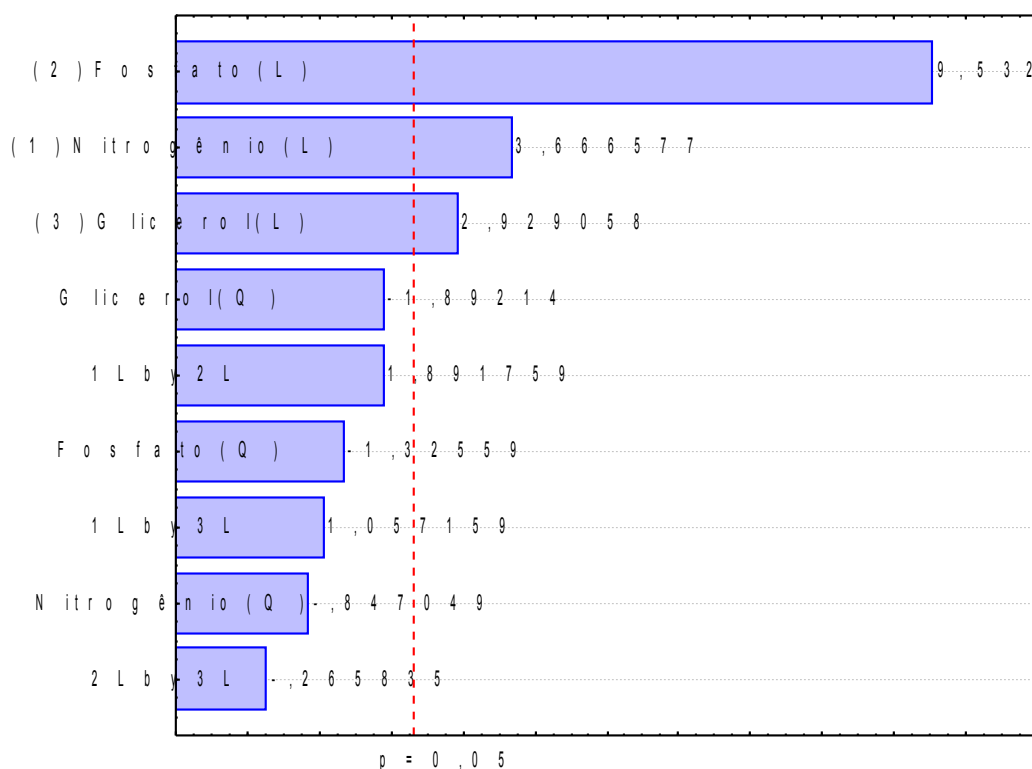


Gráfico 36 – Gráfico de Pareto mostrando os efeitos das variáveis independentes sobre a variável resposta gramas de biomassa seca por litro de meio de cultura em 8 dias de cultivo

Tabela 27 – Análise dos efeitos das variáveis independentes sobre a variável-resposta gramas de biomassa seca por litro de meio de cultura em 15 dias de cultivo

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t (8)	p	Lim. Conf (-95%)	Lim. Conf (+95%)
Mean/Interc	0,961	0,087	11,007	0,000	0,759	1,162
Nitrogênio (L)	0,237	0,095	2,507	0,037	0,019	0,456
Nitrogênio (Q)	0,060	0,098	0,605	0,562	-0,167	0,287
Fósforo (L)	0,621	0,095	6,555	0,000	0,402	0,839
Fósforo (Q)	0,074	0,098	0,754	0,472	-0,153	0,301
Glicerol (L)	0,123	0,095	1,296	0,231	-0,096	0,341
Glicerol (Q)	-0,015	0,098	-0,153	0,882	-0,242	0,212
1L x 2L	0,153	0,124	1,240	0,250	-0,132	0,438
1L x 3L	-0,033	0,124	-0,267	0,796	-0,318	0,252
2L x 3L	-0,029	0,124	-0,235	0,820	-0,314	0,256

(L) – linear, (Q) – quadrático, 1L x 2L – interação entre os termos lineares do nitrogênio e do fósforo, 1L x 3L – interação entre os termos lineares do nitrogênio e do glicerol, 2L x 3L – interação entre os termos lineares do fósforo e do glicerol.

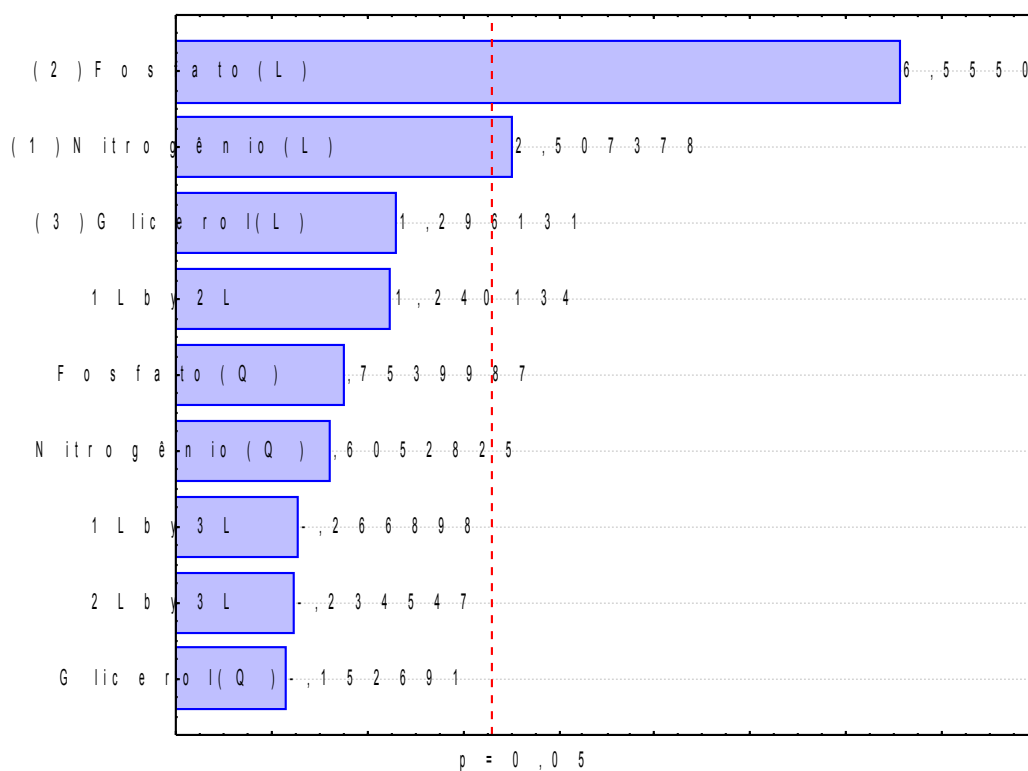


Gráfico 37 – Gráfico de Pareto mostrando os efeitos das variáveis independentes sobre a variável resposta gramas de biomassa seca por litro de meio de cultura em 15 dias de cultivo

Tabela 28 – Análise dos efeitos das variáveis independentes sobre a variável-resposta miligramas de lipídios por litro de meio de cultura em 8 dias de cultivo

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t (8)	p	Lim. Conf (-95%)	Lim. Conf (+95%)
Mean/Interc	100,607	14,163	7,103	0,000	67,946	133,267
Nitrogênio (L)	16,074	15,361	1,046	0,326	-19,349	51,497
Nitrogênio (Q)	21,192	15,978	1,326	0,221	-15,653	58,036
Fósforo (L)	48,936	15,361	3,186	0,013	13,514	84,359
Fósforo (Q)	-22,975	15,978	-1,438	0,188	-59,820	13,870
Glicerol (L)	8,701	15,361	0,566	0,587	-26,721	44,124
Glicerol (Q)	-10,351	15,978	-0,648	0,535	-47,195	26,494
1L x 2L	11,989	20,061	0,598	0,567	-34,273	58,251
1L x 3L	4,205	20,061	0,210	0,839	-42,056	50,467
2L x 3L	-18,670	20,061	-0,931	0,379	-64,931	27,592

(L) – linear, (Q) – quadrático, 1L x 2L – interação entre os termos lineares do nitrogênio e do fósforo, 1L x 3L – interação entre os termos lineares do nitrogênio e do glicerol, 2L x 3L – interação entre os termos lineares do fósforo e do glicerol.

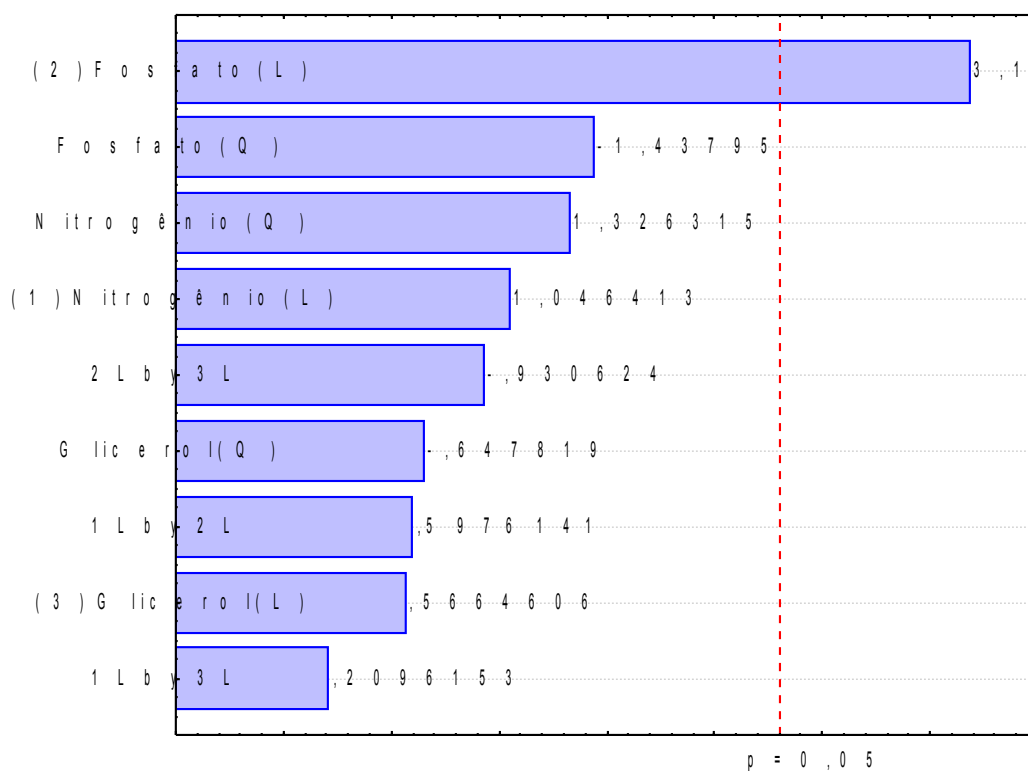


Gráfico 38 – Gráfico de Pareto mostrando os efeitos das variáveis independentes sobre a variável resposta miligramas de lipídios por litro de meio de cultura em 8 dias de cultivo

Tabela 29 – Análise dos efeitos das variáveis independentes sobre a variável-resposta miligramas de lipídios por litro de meio de cultura em 15 dias de cultivo

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t (8)	p	Lim. Conf (-95%)	Lim. Conf (+95%)
Mean/Interc	207,775	27,234	7,629	0,000	144,973	270,578
Nitrogênio (L)	29,822	29,538	1,010	0,342	-38,292	97,936
Nitrogênio (Q)	17,774	30,724	0,579	0,579	-53,074	88,623
Fósforo (L)	128,899	29,538	4,364	0,002	60,785	197,013
Fósforo (Q)	-6,655	30,724	-0,217	0,834	-77,504	64,193
Glicerol (L)	24,876	29,538	0,842	0,424	-43,238	92,990
Glicerol (Q)	1,323	30,724	0,043	0,967	-69,526	72,171
1L x 2L	-4,193	38,576	-0,109	0,916	-93,150	84,763
1L x 3L	15,314	38,576	0,397	0,702	-73,642	104,270
2L x 3L	-8,903	38,576	-0,231	0,823	-97,859	80,053

(L) – linear, (Q) – quadrático, 1L x 2L – interação entre os termos lineares do nitrogênio e do fósforo, 1L x 3L – interação entre os termos lineares do nitrogênio e do glicerol, 2L x 3L – interação entre os termos lineares do fósforo e do glicerol.

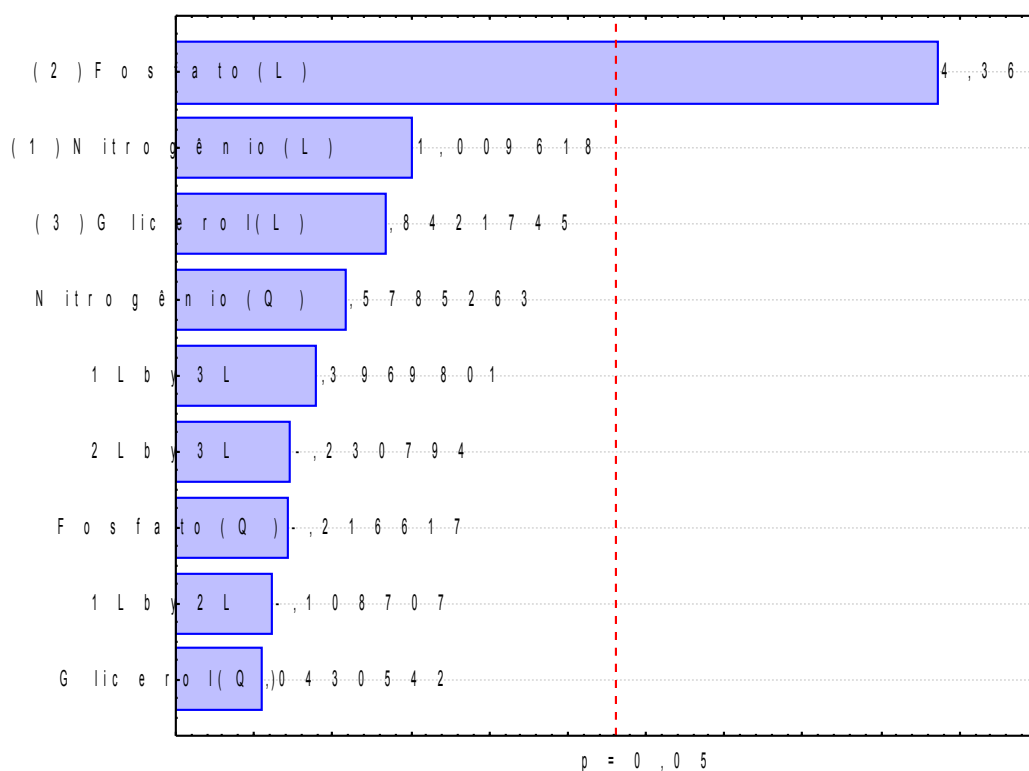


Gráfico 39 – Gráfico de Pareto mostrando os efeitos das variáveis independentes sobre a variável resposta miligramas de lipídios por litro de meio de cultura em 15 dias de cultivo

Tabela 31 – Análise dos efeitos das variáveis independentes sobre a variável-resposta percentual de lipídios por grama de biomassa seca em 8 dias de cultivo

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t (8)	p	Lim. Conf (-95%)	Lim. Conf (+95%)
Mean/Interc	12,912	0,710	18,192	0,000	11,275	14,549
Nitrogênio (L)	-0,814	0,770	-1,058	0,321	-2,590	0,961
Nitrogênio (Q)	3,353	0,801	4,188	0,003	1,507	5,200
Fósforo (L)	1,398	0,770	1,817	0,107	-0,377	3,174
Fósforo (Q)	-0,904	0,801	-1,129	0,292	-2,751	0,942
Glicerol (L)	-0,820	0,770	-1,065	0,318	-2,595	0,956
Glicerol (Q)	-0,726	0,801	-0,907	0,391	-2,573	1,120
1L x 2L	-0,748	1,005	-0,744	0,478	-3,066	1,570
1L x 3L	-0,348	1,005	-0,346	0,738	-2,666	1,970
2L x 3L	-1,764	1,005	-1,755	0,117	-4,082	0,554

(L) – linear, (Q) – quadrático, 1L x 2L – interação entre os termos lineares do nitrogênio e do fósforo, 1L x 3L – interação entre os termos lineares do nitrogênio e do glicerol, 2L x 3L – interação entre os termos lineares do fósforo e do glicerol.

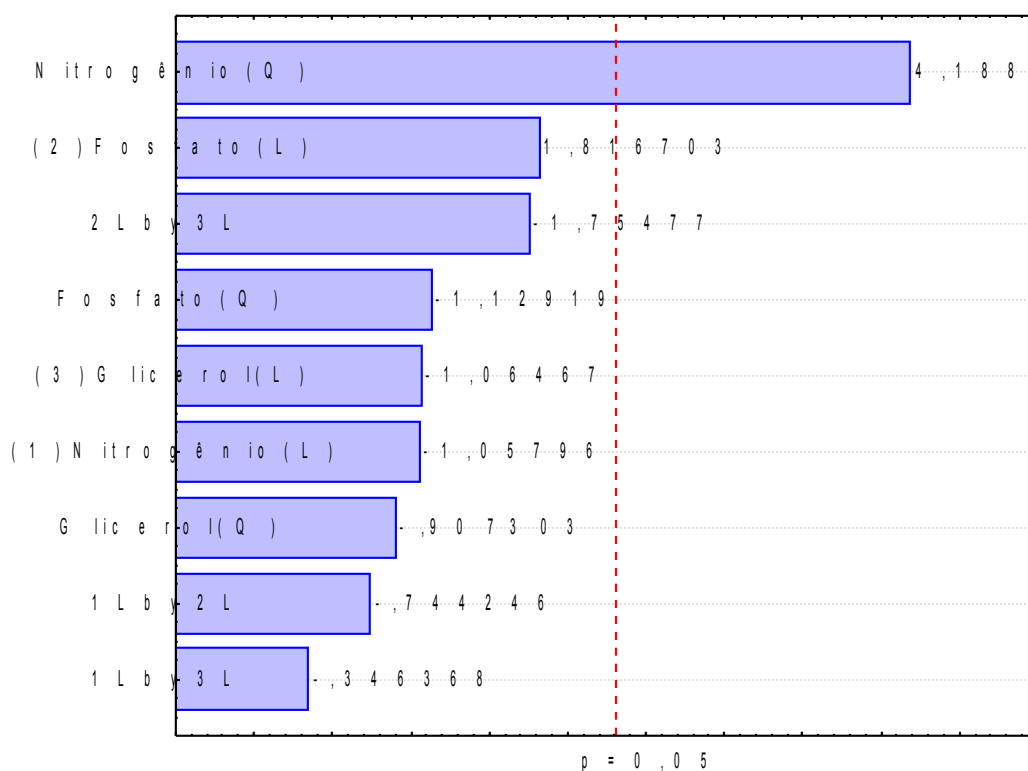


Gráfico 40 – Gráfico de Pareto mostrando os efeitos das variáveis independentes sobre a variável resposta percentual de lipídios por grama de biomassa seca em 8 dias de cultivo

Tabela 32 – Análise dos efeitos das variáveis independentes sobre a variável-resposta percentual de lipídios por grama de biomassa seca em 15 dias de cultivo

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t (8)	p	Lim. Conf (-95%)	Lim. Conf (+95%)
Mean/Interc	21,590	0,796	27,107	0,000	19,753	23,427
Nitrogênio (L)	-1,629	0,864	-1,886	0,096	-3,621	0,363
Nitrogênio (Q)	0,746	0,899	0,831	0,430	-1,326	2,818
Fósforo (L)	0,803	0,864	0,930	0,380	-1,189	2,795
Fósforo (Q)	-2,539	0,899	-2,825	0,022	-4,611	-0,467
Glicerol (L)	-0,117	0,864	-0,136	0,895	-2,109	1,875
Glicerol (Q)	0,456	0,899	0,508	0,625	-1,616	2,528
1L x 2L	-3,044	1,128	-2,698	0,027	-5,646	-0,442
1L x 3L	1,165	1,128	1,033	0,332	-1,436	3,767
2L x 3L	-0,439	1,128	-0,389	0,708	-3,040	2,163

(L) – linear, (Q) – quadrático, 1L x 2L – interação entre os termos lineares do nitrogênio e do fósforo, 1L x 3L – interação entre os termos lineares do nitrogênio e do glicerol, 2L x 3L – interação entre os termos lineares do fósforo e do glicerol.

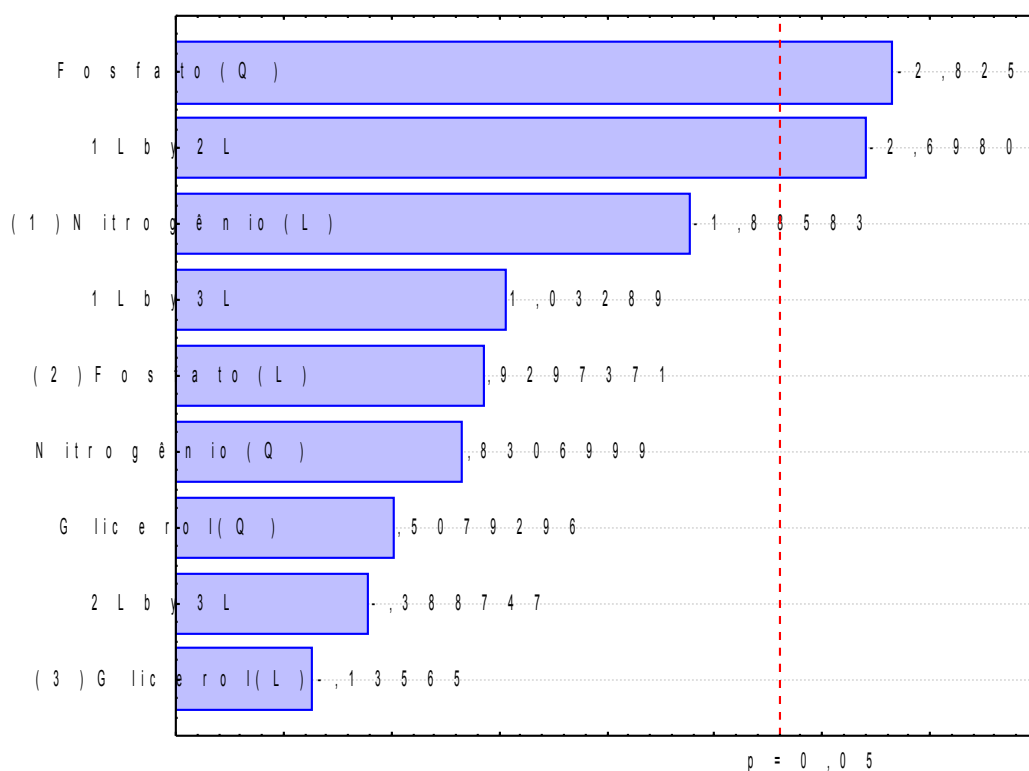


Gráfico 41 – Gráfico de Pareto mostrando os efeitos das variáveis independentes sobre a variável resposta percentual de lipídios por grama de biomassa seca em 15 dias de cultivo

Tabela 33 – Análise dos efeitos das variáveis independentes sobre a variável-resposta percentual de acilgliceróis por lipídios extraídos em 8 dias de cultivo

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t (8)	p	Lim. Conf (-95%)	Lim. Conf (+95%)
Mean/Interc	92,848	3,386	27,420	0,000	85,040	100,657
Nitrogênio (L)	-1,086	3,673	-0,296	0,775	-9,555	7,383
Nitrogênio (Q)	-8,608	3,820	-2,254	0,054	-17,417	0,200
Fósforo (L)	-3,824	3,673	-1,041	0,328	-12,293	4,645
Fósforo (Q)	-8,343	3,820	-2,184	0,060	-17,152	0,465
Glicerol (L)	15,215	3,673	4,143	0,003	6,746	23,684
Glicerol (Q)	-7,841	3,820	-2,053	0,074	-16,650	0,968
1L x 2L	6,509	4,796	1,357	0,212	-4,551	17,569
1L x 3L	-5,009	4,796	-1,044	0,327	-16,069	6,052
2L x 3L	5,543	4,796	1,156	0,281	-5,518	16,603

(L) – linear, (Q) – quadrático, 1L x 2L – interação entre os termos lineares do nitrogênio e do fósforo, 1L x 3L – interação entre os termos lineares do nitrogênio e do glicerol, 2L x 3L – interação entre os termos lineares do fósforo e do glicerol.

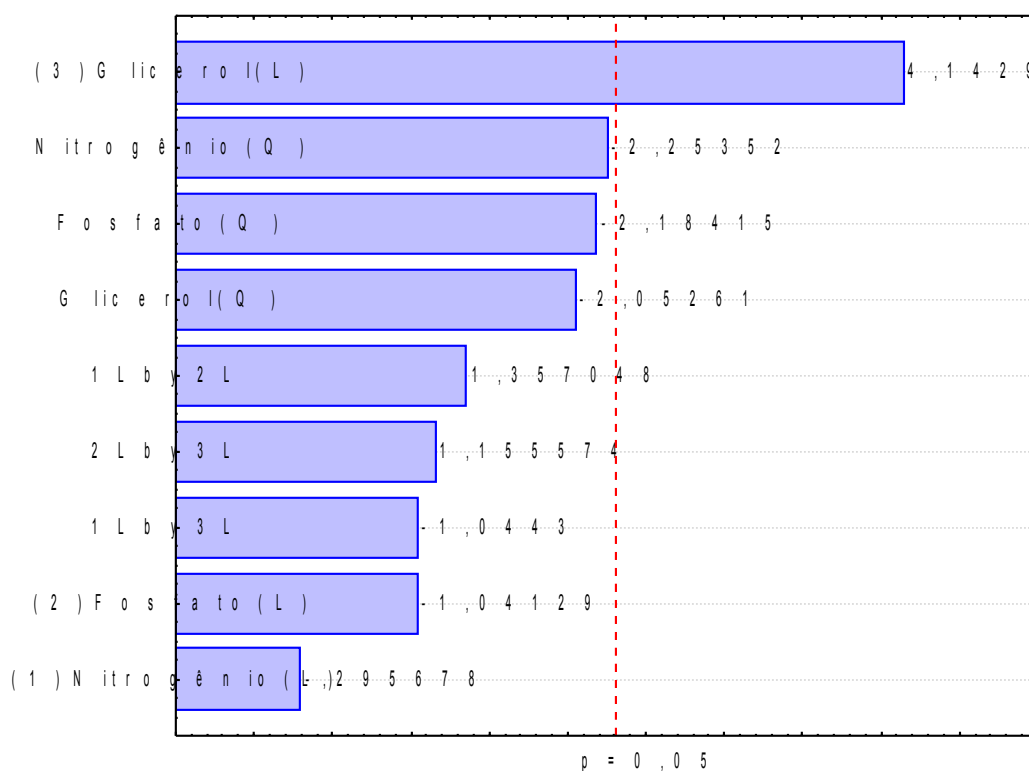


Gráfico 42 – Gráfico de Pareto mostrando os efeitos das variáveis independentes sobre a variável resposta percentual de acilgliceróis por lipídios extraídos em 8 dias de cultivo

Tabela 34 – Análise dos efeitos das variáveis independentes sobre a variável-resposta percentual de acilgliceróis por lipídios extraídos em 15 dias de cultivo

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t (8)	p	Lim. Conf (-95%)	Lim. Conf (+95%)
Mean/Interc	128,003	6,125	20,898	0,000	113,878	142,127
Nitrogênio (L)	-15,046	6,643	-2,265	0,053	-30,366	0,273
Nitrogênio (Q)	-14,037	6,910	-2,031	0,077	-29,972	1,897
Fósforo (L)	-13,682	6,643	-2,060	0,073	-29,002	1,637
Fósforo (Q)	20,875	6,910	3,021	0,017	4,941	36,810
Glicerol (L)	12,374	6,643	1,863	0,100	-2,946	27,693
Glicerol (Q)	3,363	6,910	0,487	0,639	-12,571	19,298
1L x 2L	-1,093	8,676	-0,126	0,903	-21,101	18,914
1L x 3L	4,122	8,676	0,475	0,647	-15,885	24,129
2L x 3L	16,133	8,676	1,860	0,100	-3,874	36,140

(L) – linear, (Q) – quadrático, 1L x 2L – interação entre os termos lineares do nitrogênio e do fósforo, 1L x 3L – interação entre os termos lineares do nitrogênio e do glicerol, 2L x 3L – interação entre os termos lineares do fósforo e do glicerol.

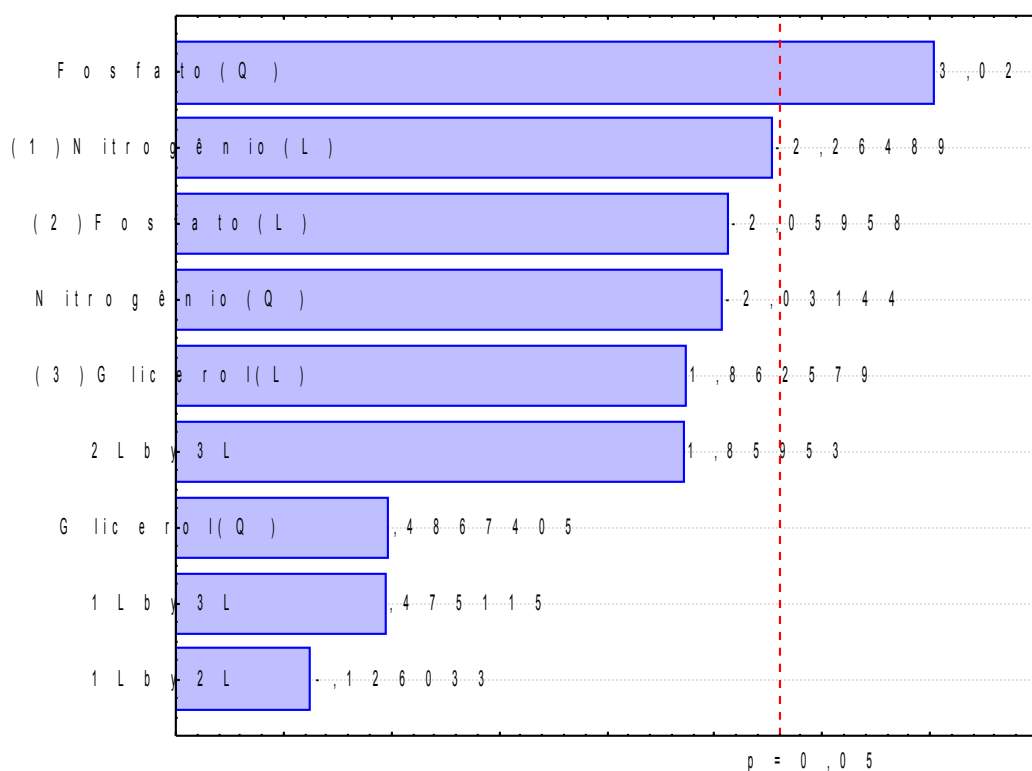


Gráfico 43 – Gráfico de Pareto mostrando os efeitos das variáveis independentes sobre a variável resposta percentual de acilgliceróis por lipídios extraídos em 15 dias de cultivo

Tabela 35 – Análise dos efeitos das variáveis independentes sobre a variável-resposta miligramas de acilgliceróis por litro de meio de cultura em 8 dias de cultivo

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t (8)	p	Lim. Conf (-95%)	Lim. Conf (+95%)
Mean/Interc	90,048	8,656	10,403	0,000	70,088	110,008
Nitrogênio (L)	15,171	9,388	1,616	0,145	-6,477	36,820
Nitrogênio (Q)	0,914	9,765	0,094	0,928	-21,604	23,431
Fósforo (L)	49,624	9,388	5,286	0,001	27,976	71,273
Fósforo (Q)	-11,295	9,765	-1,157	0,281	-33,813	11,222
Glicerol (L)	22,118	9,388	2,356	0,046	0,469	43,766
Glicerol (Q)	-13,728	9,765	-1,406	0,197	-36,246	8,789
1L x 2L	14,508	12,260	1,183	0,271	-13,764	42,781
1L x 3L	1,835	12,260	0,150	0,885	-26,438	30,107
2L x 3L	-6,279	12,260	-0,512	0,622	-34,551	21,994

(L) – linear, (Q) – quadrático, 1L x 2L – interação entre os termos lineares do nitrogênio e do fósforo, 1L x 3L – interação entre os termos lineares do nitrogênio e do glicerol, 2L x 3L – interação entre os termos lineares do fósforo e do glicerol.

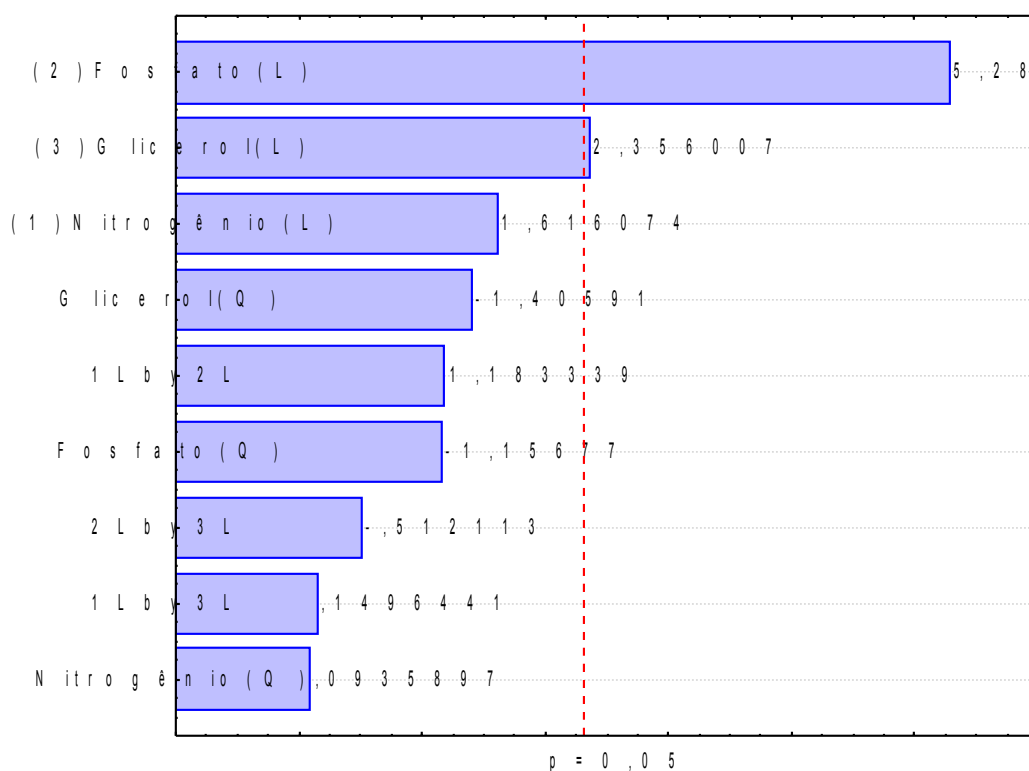


Gráfico 44 – Gráfico de Pareto mostrando os efeitos das variáveis independentes sobre a variável resposta miligramas de acilgliceróis por litro de meio de cultura em 8 dias de cultivo

Tabela 36 – Análise dos efeitos das variáveis independentes sobre a variável-resposta miligramas de acilgliceróis por litro de meio de cultura em 15 dias de cultivo

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t (8)	p	Lim. Conf (-95%)	Lim. Conf (+95%)
Mean/Interc	157,042	21,946	7,156	0,000	106,434	207,649
Nitrogênio (L)	7,848	23,802	0,330	0,750	-47,040	62,736
Nitrogênio (Q)	27,779	24,758	1,122	0,294	-29,313	84,871
Fósforo (L)	109,759	23,802	4,611	0,002	54,871	164,647
Fósforo (Q)	25,568	24,758	1,033	0,332	-31,524	82,659
Glicerol (L)	22,491	23,802	0,945	0,372	-32,398	77,379
Glicerol (Q)	-4,260	24,758	-0,172	0,868	-61,351	52,832
1L x 2L	-16,360	31,085	-0,526	0,613	-88,043	55,324
1L x 3L	-10,139	31,085	-0,326	0,753	-81,822	61,544
2L x 3L	-15,434	31,085	-0,497	0,633	-87,118	56,249

(L) – linear, (Q) – quadrático, 1L x 2L – interação entre os termos lineares do nitrogênio e do fósforo, 1L x 3L – interação entre os termos lineares do nitrogênio e do glicerol, 2L x 3L – interação entre os termos lineares do fósforo e do glicerol.

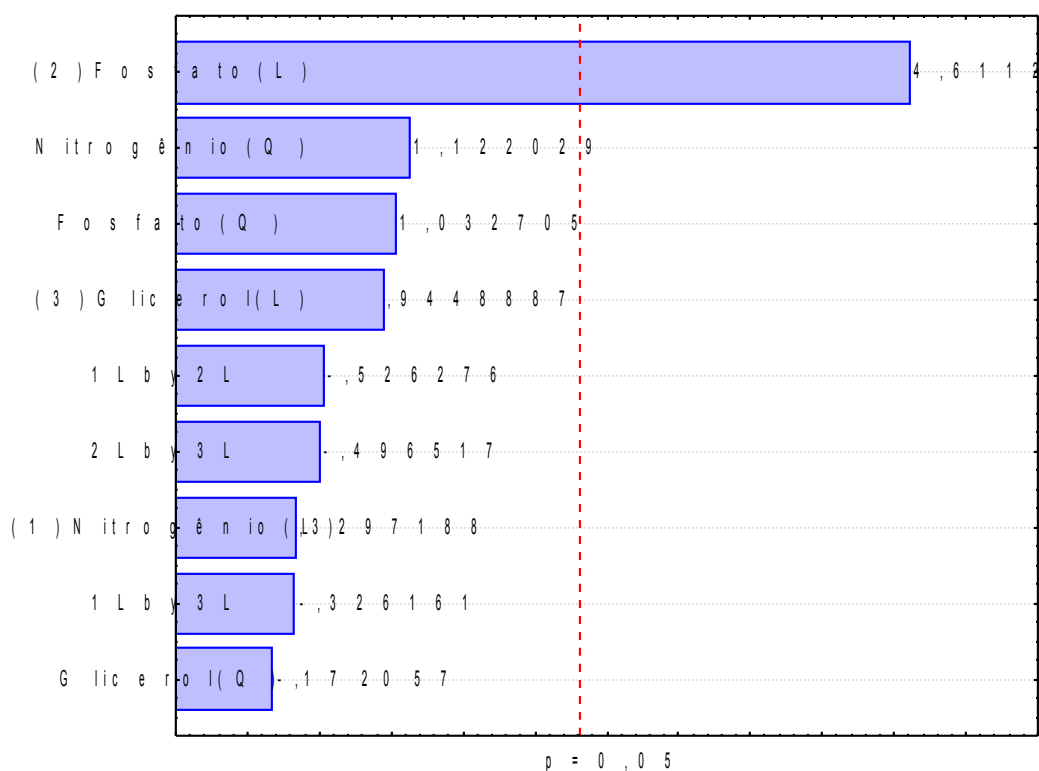


Gráfico 45 – Gráfico de Pareto mostrando os efeitos das variáveis independentes sobre a variável resposta miligramas de acilgliceróis por litro de meio de cultura em 15 dias de cultivo